



Les cibles moléculaires du récepteur minéralocorticoïde dans le coeur

Basile Gravez

► To cite this version:

Basile Gravez. Les cibles moléculaires du récepteur minéralocorticoïde dans le coeur. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066055 . tel-01147139

HAL Id: tel-01147139

<https://theses.hal.science/tel-01147139>

Submitted on 29 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED394 Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

UMRS1138 / Récepteur minéralocorticoïde : physiopathologie et innovations thérapeutiques

Les cibles moléculaires du récepteur minéralocorticoïde dans le cœur

Par Basile GRAVEZ

Thèse de doctorat de Physiologie

Dirigée par le Docteur Frédéric JAISSE

Présentée et soutenue publiquement le 27 février 2015

Devant un jury composé de :

Professeur Jacques TEULON

Docteur Patrick LACOLLEY

Docteur Paul MULDER

Docteur Claude DELCAYRE

Docteur Natalia LOPEZ-ANDRES

Docteur Frédéric JAISSE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED394 Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

UMRS1138 / Récepteur minéralocorticoïde : physiopathologie et innovations thérapeutiques

**Les cibles moléculaires du récepteur minéralocorticoïde
dans le cœur**

Par Basile GRAVEZ

Thèse de doctorat de Physiologie

Dirigée par le Docteur Frédéric JAISSE

Présentée et soutenue publiquement le 27 février 2015

Devant un jury composé de :

Professeur Jacques TEULON

Docteur Patrick LACOLLEY

Docteur Paul MULDER

Docteur Claude DELCAYRE

Docteur Natalia LOPEZ-ANDRES

Docteur Frédéric JAISSE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

Je te dédie cette thèse papa, toi qui ne la liras pas.

REMERCIEMENTS

Avant d'exposer les résultats de ce travail, je tiens à remercier toutes celles et ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation :

Frédéric JAISSER, mon directeur de thèse, pour m'avoir accepté dans son équipe. Son exigence, ses conseils et sa qualité d'écoute m'ont permis d'effectuer cette thèse dans d'excellentes conditions.

Les docteurs **Patrick LACOLLEY** et **Paul MULDER** qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Les docteurs **Claude DELCAYRE** et **Natalia LOPEZ-ANDRES** qui ont accepté d'être examinateurs de ce travail de thèse (un merci particulier à Natalia pour ta bienveillance et ta gentillesse à mon égard, en espérant que cette lecture ne te fasse pas changer d'avis sur moi).

Le professeur **Jacques TEULON** pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Ces mots sont là pour exprimer toute l'admiration que j'ai pour vous.

Je remercie évidemment tous les membres de l'équipe 1 que j'ai eu la chance de côtoyer : **Alessandra, Claudine, Clémence, Gwennan, Isabelle Célérier, Isabelle Ricard, Jenny, Maryse, Sonia, Alan, Antoine, Jonatan, JPB et Mathieu** (que j'ai eu le plaisir d'encadrer). Merci à vous **Brigitte** et **Sandrine** pour votre bonne humeur constante, à **Soumaya** pour ta douceur et ton aide précieuse, à **Cristian** le plus génial des Marica, à mes collègues mais néanmoins amis **Fouad** et **Guillaume**, à **Riccardo**, cet italien à qui je tiens tant, à **Smaïl** qui m'a tout appris et qui continue à m'aider même à plusieurs milliers de kilomètres de moi, et bien sûr à vous **Nicolette**, pour m'avoir permis de lier avec vous une relation privilégiée.

Ces quatre années passées aux Cordeliers m'ont aussi donné l'opportunité de rencontrer (parfois contre leur gré) les autres membres de ce centre scientifique que je salue ici. J'aimerais remercier particulièrement tous les Jeunes Chercheurs des Cordeliers avec qui j'ai pu organiser différents événements, qui ont contribué à sortir un peu de la vie du labo pour décompresser et à lier de jolies amitiés. Un grand merci à notre cuisinière **Charlotte** et au meilleur compagnon de boisson jamais connu **Ivan**. Merci aussi à l'équipe 2 en entier, particulièrement cette fille extraordinaire qu'est **Dorinne, Anthony** pour ta joie de vivre et ta classe légendaire, et bien sûr **Louis** et **Ludovic** qui m'ont appris la différence entre roux et blond vénitien. Sans l'équipe 19, je n'aurais jamais pu faire en temps et en heure plusieurs de mes expériences. Merci surtout à **Audrey** et **Adrien, Claire** pour ta simplicité et ton écoute, **Laure** parce que tu es parfaite (et que tu rigoles à mes blagues !) et **Lauriane** pour ton dynamisme et ta coolitude (mais si ça existe !). Et difficile d'oublier **Thomas** et son opinel.

Avant de pouvoir entamer ce travail de thèse, j'ai passé deux années au sein du master BIP où j'ai rencontré des personnes géniales, vécu des soirées dantesques et lié des amitiés sincères. Merci donc à **Célia, Clélia, Laura, Mélissa, Antoine** (alias touffe même s'il n'en a plus désormais), **Antoine** (alias toto, toujours présent dans les moments importants), **Gaëtan, Hugues, Tristan** et **Vasco**. Comment exprimer au mieux ce que je pense de maman **Garthiga**, de sa gentillesse et de son intérêt permanents à mon égard, de ce couple parfait que forme **Isa-Belle** et **Nicolas**, de mon amie **Marine**, avec qui je chante et je parle de tout, de **Marion** cette femme exceptionnelle, juke-box ambulant à la voix si reconnaissable, de **Pauline** qui a su rester près de moi, même exilée à Strasbourg, d'**Alexandre**, qui m'a fait connaître ce master et qui aime comme moi le vrai rock, de **Romain** certainement la personne

la plus généreuse que je connaisse, de **Samuel** et de son flegme légendaire, son humour dévastateur et son art de l'attaque de ..., et enfin de **Vincent**, de sa gentillesse et de son dévouement pour les autres. Merci pour tout. Vraiment !

Merci à toi **Renaud**, pour ta présence. Tu as toujours été là durant ces cinq années parisiennes... et ça, c'est bien !

Un merci simple mais qui veut dire tout, à mon **Quentin**. Tu es quelqu'un d'extraordinaire.

Que dire de ma colocataire **Dimitra** ! Merci pour le yoga, pour les restes de vos plats que tu me laissais quand je rentrais tard du labo et pour ces moments chaleureux passés dans cet appart'.

Et puis, il y a **Manale**. Mon autre colocataire, mais cet adjectif est peu représentatif de la place particulière que tu as dans mon cœur. Rien de ce que je pourrais écrire ne saurait être à la hauteur de la fierté, et de la chance, que j'ai de faire partie de tes amis.

Un grand merci à mes amis de Fougères et de Rennes. **Blandine**, cette fille pétillante découverte en Grèce et qui est toujours là depuis, **Pierre-Axel**, mon ami si cher de la fac de médecine, **Adeline**, **Axelle**, **Carole**, **Céline**, **Charlotte** (et son rire), **Virginie**, **Benjamin** (alias Lover) et **Kévin**, mes amis de toujours avec qui j'ai grandi. Une pensée particulière pour **Guillaume** et **François**, avec qui je n'ai passé que de bons moments et avec qui je compte bien continuer dans ce sens. Merci à toi mon **Christophe**, qui me supportes depuis si longtemps.

Et je te remercie toi **Thomas**. Pour ton soutien inébranlable, ton humour salvateur et ta présence auprès de ma famille. Tu es et resteras bien plus qu'un ami.

Merci bien sûr à toute ma famille. Merci surtout à mon tonton **Gérard** et à ma tante **Kumiko** qui m'ont hébergé et materné pendant mes premières années dans cette jungle parisienne et merci à **Hyun**. Ton satané chat nous a rapprochés, pour mon plus grand plaisir.

Merci à toi **Mathilde**. Pour tout ce que tu me permets de vivre. Je ne sais pas si je te le dis assez souvent. Maintenant c'est écrit pour toujours dans cette thèse.

Et je termine ces remerciements par les trois personnes les plus importantes dans ma vie. Ma maman **Frédérique**, ma sœur **Clémentine** et mon frère **Matthieu**.
Tout simplement : MERCI.

“Et basilou il vous aime tous comme un fou, allez allez” (à crier en rythme en levant les bras).

N.B : je tenais également à ne pas remercier mon pire ennemi de primaire, **Philippe Germès**.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES ILLUSTRATIONS	12
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	13
AVANT-PROPOS	14
PARTIE 1 : INTRODUCTION	15
1.1 Les pathologies cardiovasculaires	15
1.2 Le récepteur minéralocorticoïde.....	17
1.2.1 Structure du gène codant pour le RM.....	17
1.2.2 Structure du RM	19
1.2.3 Ligands du RM.....	22
1.2.3.1 Hormone minéralocorticoïde aldostérone	22
1.2.3.2 Hormones glucocorticoïdes	26
1.2.3.3 Sélectivité de liaison de l'aldostérone au RM	26
1.2.3.3.1 Sélectivité enzymatique : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2.....	27
1.2.3.3.2 Autres mécanismes de sélectivité de l'aldostérone au RM	28
1.3 Bénéfices de l'inhibition du récepteur minéralocorticoïde en clinique.....	29
1.3.1 Antagonistes pharmacologiques du RM	29
1.3.2 Effets de l'antagonisme du RM dans l'hypertension	30
1.3.3 Effets de l'antagonisme du RM dans l'insuffisance cardiaque	30
1.3.3.1 Phénomène d'échappement de l'aldostérone	30
1.3.3.2 Etude RALES	31
1.3.3.3 Etude EPHESUS	32
1.3.3.4 Autres études	33
1.3.4 Effets de l'antagonisme du RM sur l'infarctus du myocarde.....	33
1.3.5 Effets de l'antagonisme du RM dans les troubles du rythme cardiaque	34
1.3.6 Emergence d'antagonistes non-stéroïdiens	34
1.4 Mécanismes d'action du RM.....	35
1.4.1 Effets non génomiques du RM.....	35
1.4.2 Effets génomiques du RM.....	36
1.5 Rôle physiopathologique du RM dans le cœur et le rein	37
1.5.1 Effets génomiques classiques du RM dans l'épithélium rénal.....	38
1.5.2 Effets génomiques du RM cardiaque	41
1.5.2.1 Blocage pharmacologique du RM <i>in vivo</i>	42
1.5.2.2 Implication du RM dans les pathologies cardiaques	43
1.5.2.3 Etude de la signalisation cardiaque du RM <i>in vitro</i>	44
1.5.2.4 L'apport des modèles transgéniques dans la compréhension de la signalisation du RM.....	44
1.5.2.5 Rôle du RM dans les arythmies cardiaques	47

1.5.2.5.1 Effets du RM sur les arythmies cardiaques en clinique.....	47
1.5.2.5.2 Effets du RM sur les arythmies cardiaques chez l'animal.....	47
1.6 Objectifs de la thèse	49
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	51
2.1 Modèles animaux	51
2.1.1 Surexpression conditionnelle du RM spécifiquement dans les cardiomyocytes.....	51
2.1.2 Protocoles	52
2.1.2.1 Effet de l'infusion d'aldostérone sur les souris RM-Cardio	52
2.1.2.1.1 Administration du traitement.....	52
2.1.2.1.2 Préparation du cœur.....	53
2.1.2.1.3 Extraction des ARNs totaux, réalisation et analyse du transcriptome.....	53
2.1.2.2 Etude des microARNs comme cibles potentielles du RM	54
2.1.2.2.1 Extraction des microARNs totaux, et réalisation du miRnome.....	54
2.1.2.2.2 Analyse du miRnome	54
2.1.2.2.3 Rétrotranscription et PCR quantitative des microARNs cibles.....	55
2.1.2.3 Effets du torasémide <i>in vivo</i>	56
2.1.2.3.1 Modèle pharmacologique DOCA-Sel d'excès de minéralocorticoïde	56
2.1.2.3.2 Extraction des ARNs totaux et rétrotranscription.....	56
2.1.2.3.3 PCR quantitative.....	57
2.2 Modèles cellulaires.....	58
2.2.1 Lignées cellulaires.....	58
2.2.1.1 Lignée cellulaire H9C2-RM ⁺	58
2.2.1.2 Lignée cellulaire H9C2-RM ⁺ /MMTV-Luciférase.....	59
2.3 Analyses statistiques	60
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS	61
3.1 Approche pharmacologique	61
3.1.1 Effets <i>in vitro</i> du torasémide sur la signalisation du RM cardiaque	61
3.1.1.1 Etat de la question	61
3.1.1.2 Objectif de l'étude	62
3.1.1.3 Article: The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes	62
3.1.1.4 Conclusions de l'étude et discussion.....	65
3.1.2 Effets <i>in vivo</i> du torasémide sur la signalisation du RM cardiaque	67
3.1.2.1 Etat de la question	67
3.1.2.2 Objectif de l'étude	67
3.1.2.3 Protocole d'activation du RM <i>in vivo</i>	68
3.1.2.4 Le torasémide diminue l'expression de certains gènes participant au remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque	69
3.1.2.5 Le torasémide n'intervient pas dans la modulation de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase.....	70
3.1.2.6 Conclusions de l'étude et discussion.....	71
3.2 Approche génétique.....	72

3.2.1 CTGF comme gène candidat de premier choix dans la compréhension de la voie de signalisation du RM cardiaque	73
3.2.1.1 Etat de la question	73
3.2.1.2 Objectif de l'étude	73
3.2.1.3 Article: Aldosterone-Specific Activation of Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor <i>In Vivo</i>	74
3.2.1.4 Conclusions de l'étude et discussion.....	81
3.2.2 Etude transcriptomique cardiaque globale	82
3.2.2.1 Etat de la question	82
3.2.2.2 Objectif de l'étude	83
3.2.2.3 Article : Aldosterone Promotes Cardiac Endothelial Cells Proliferation <i>In Vivo</i>	83
3.2.2.4 Conclusions de l'étude et discussion.....	84
3.2.2.5 Implication du RM dans la prolifération des cellules endothéliales cardiaques induite par l'aldostérone	85
3.2.3 Implications des microARNs dans la voie de signalisation du RM cardiaque	89
3.2.3.1 Etat de la question	89
3.2.3.2 Objectif de l'étude	89
3.2.3.3 Comparaison du miRnome des souris RM-Cardio par rapport à celui de leurs contrôles	90
3.2.3.4 Pertinence physiopathologique de la modulation du miR-1941-5p par le RM cardiaque	90
3.2.3.5 Conclusions de l'étude et discussion.....	92
PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE	94
4.1 Comparaison entre torasémide et spironolactone.....	94
4.2 Cibles moléculaires du RM dans le cœur	95
4.2.1 CTGF.....	95
4.2.2 Aldostérone et prolifération	96
4.2.3 MicroARNs	98
PARTIE 5 : PERSPECTIVES	100
BIBLIOGRAPHIE	103
ANNEXES	119

LISTE DES ABREVIATIONS

11 β -HSD2 :	11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
α ENaC :	Sous-unité α du canal épithélial sodique, pour <i>α epithelial sodium channel</i>
α MHC :	Chaîne lourde α de la myosine, pour <i>α myosin heavy chain</i>
ACTH :	Hormone adrénocorticotrope, pour <i>adrenocorticotropic hormone</i>
Adamts1 :	Peptidase avec motifs thrombospondines de type 1, pour <i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>
Adamts4 :	Peptidase avec motifs thrombospondines de type 4, pour <i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP :	Adénosine diphosphate
AF :	Domaine de régulation de l'activité transcriptionnelle, pour <i>Activation Function</i>
Aldo :	Aldostérone
ANOVA :	Test statistique d'analyse de la variance, pour <i>ANalysis Of VAriance</i>
ANP :	Facteur atrial natriurétique, pour <i>atrial natriuretic peptide</i>
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messager
ARTS :	Etude clinique de nom <i>minerAlocorticoid Receptor antagonist Tolerability Study</i>
ASCOT-BPLA :	Etude Clinique de nom <i>Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm</i>
AT1 :	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
ATP :	Adénosine triphosphate
ATP1A1 :	Gène codant pour la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe ionique ATPasique sodium/potassium
BNP :	Facteur natriurétique de type B, pour <i>brain natriuretic peptide</i>
C :	Canrénoate de potassium (antagoniste du récepteur minéralocorticoïde)
C57BL/6JRj :	Lignée congénique de souris de laboratoire
Cav-1 :	Cavéoline-1
Ccnb1 :	Cycline B1
CD4 ⁺ :	Cluster de différenciation de type 4 positif
Cdk1 :	Kinase dépendante des cyclines de type 1, pour <i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
Cdk5 :	Kinase dépendante des cyclines de type 5, pour <i>Cyclin-dependent kinase 5</i>

Col I et III :	Collagène I et Collagène III
CONSENSUS :	Etude clinique de nom <i>COoperative North Scandivian ENalapril SURvival Study</i>
CTGF :	Facteur de croissance du tissu conjonctif, pour <i>connective tissue growth factor</i>
Ctrl :	Groupe contrôle ou souris contrôle
CYP11B2 :	Gène codant pour l'enzyme aldostérone synthase
DLA :	Domaine de liaison à l'acide désoxyribonucléique
DLL :	Domaine de liaison du ligand hormonal
DMEM/F12 :	Milieu de culture cellulaire, pour <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DNase I :	désoxyribonucléase de type I
DOCA :	Acétate de désoxycorticostérone, pour <i>deoxycorticosterone acetate</i>
Dox :	Doxycycline
ECA :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ELL :	Facteur d'élongation de l'ARN polymérase II, pour <i>eleven-nineteen lysine-rich leukemia</i>
EMPHASIS-HF :	Etude Clinique de nom <i>Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And SURvival Study in Heart Failure</i>
ENaC :	Canal épithélial sodique, pour <i>epithelial sodium channel</i>
EPHESUS :	Etude clinique de nom <i>Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study</i>
ERH :	Eléments de réponse hormonale
ERK1/2 :	Kinase ERK1/2, pour <i>extracellular-regulated kinase1/2</i>
ESM :	Erreur standard à la moyenne
G418 :	Antibiotique de la famille des aminoglycosides
GILZ-1 :	Protéine à domaine leucine zipper induite par les glucocorticoïdes de type 1, pour <i>glucocorticoid-induced leucine zipper protein-1</i>
GPR30 :	Récepteur membranaire couplé aux protéines G de type 30, pour <i>G protein-coupled receptor 30</i>
HSP :	Protéine de choc thermique, pour <i>Heat Shock Protein</i>
HUVEC :	Cellules endothéliales humaines issues de veine ombilicale, pour <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1 :	Molécule d'adhérence intercellulaire de type 1, pour <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IKr :	Courants potassiques correcteurs, pour <i>rapidly-activating delayed rectifier potassium currents</i>
KCNJ3 :	Gène codant pour le canal potassique Kir de type 3.1
KCNJ5 :	Gène codant pour le canal potassique Kir de type 3.4

Kd :	Constante de dissociation, pour <i>dissociation constant</i>
Ki-67 :	Index de prolifération cellulaire
Kir3.1 :	Canal potassique Kir de type 3.1, pour <i>Inward rectifying K⁺ channel 3.1</i>
Kir3.4 :	Canal potassique Kir de type 3.4, pour <i>Inward rectifying K⁺ channel 3.4</i>
Luc :	Luciférase
MC2R :	Gène codant pour l'hormone adrénocorticotrope
MCP1 :	Chimiokine attractant les monocytes de type 1, pour <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
miR :	Micro-acide ribonucléique
miRnome :	Etude de l'ensemble des micro-acides ribonucléiques transcrits
MMP-2 et -9 :	Métalloprotéases matricielles de type 2 et 9, pour <i>matrix-metalloproteinase-1 and -9</i>
MMTV :	Région génique du rétrovirus <i>Mouse Mammary Tumor Virus</i> contenant des éléments de réponse hormonale reconnus par le RM
M-SHRSP :	Rat spontanément hypertendu et sensible aux accidents vasculaires avec une hypertension très sévère, pour <i>malignant-stroke-prone spontaneously hypertensive</i>
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase :	Pompe ionique ATPasique sodium/potassium
NADPH oxydase :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase sous forme réduite, pour <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>
NAS :	Néphrectomie-Aldostérone-Sel
Nedd4-2 :	Protéine de la famille des ubiquitines ligases, pour <i>Neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4-member 2</i>
NGFI :	Récepteurs nucléaires induits par les facteurs de croissance neuronaux, pour <i>nuclear receptor superfamily/nerve growth factor-induced</i>
NR3C2 :	Gène codant pour le récepteur minéralocorticoïde, pour <i>Nuclear Receptor sub-family 3 group C member 2</i>
PAI-1 :	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1, pour <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PBS :	Tampon phosphate salin, pour <i>phosphate buffer saline</i>
PIAS-1 :	Protéine de la famille des SUMOs-ligases de type 1, pour <i>protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-1</i>
Pu (A et G) :	Bases puriques : Adénine et Guanine
Py (C et T) :	Bases pyrimidiques : Cytosine et Thymine
qPCR :	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative, pour <i>quantitative Polymerase Chain Réaction</i>
QT et ST :	Noms des ondes correspondantes sur un électrocardiogramme
RALES :	Etude clinique de nom <i>Randomized ALdactone Evaluation Study</i>
REMINDER :	Etude clinique de nom <i>early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure</i>

RG :	Récepteur glucocorticoïde
RG-Cardio :	Souris surexprimant spécifiquement le récepteur glucocorticoïde humain dans les cardiomyocytes
Rgs-2 :	Protéine de type 2 de la famille des régulateurs de la signalisation <i>via</i> les petites protéines G, pour <i>Regulator of G-protein signalling-2</i>
RISC :	Complexe RISC, pour <i>ribonucleic acid-induced silencing complex</i>
RM :	Récepteur minéralocorticoïde
RM-Cardio :	Souris surexprimant spécifiquement le récepteur minéralocorticoïde humain dans les cardiomyocytes
RMh :	Récepteur minéralocorticoïde humain
RNase :	Ribonucléase
SAVE :	Etude clinique de nom <i>Survival And Ventricular Enlargement</i>
SEN :	Signal d'export nucléaire
Serpin :	Protéases de la famille des serpin, pour <i>serine protease inhibitors</i>
Sgk-1 :	Sérine/thréonine kinase régulée par le sérum et les glucocorticoïdes de type 1, pour <i>Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1</i>
SHRSP :	Rat spontanément hypertendu et sensible aux accidents vasculaires, pour <i>stroke-prone spontaneously hypertensive</i>
SLN :	Signal de localisation nucléaire
Spiro ou S :	Spironolactone
SRAA :	Système rénine-angiotensine-aldostérone
SRC-1 :	Co-activateur de type 1 des récepteurs stéroïdes, pour <i>steroid receptor coactivator-1</i>
SUMOs :	Petites protéines permettant la sumoylation, pour <i>Small Ubiquitin-related MOdifiers</i>
tetO :	Opérateur sensible à la tétracycline
TGF- β :	Facteur profibrosant, pour <i>transforming growth factor-β</i>
TIMP-1 :	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases matricielles de type 1, pour <i>tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases-1</i>
TOPCAT :	Etude Clinique de nom <i>Treatment Of Preserved Cardiac function heart failure with an Aldosterone Antagonist</i>
Tora ou T :	Torasémide
Trpc4 :	Canal perméable au calcium, pour <i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4</i>
tTA :	Protéine transactivatrice
Ubc :	Ubiquitine C
VEGF-a :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire de type a, pour <i>vascular endothelial growth factor-a</i>

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Schéma de la structure du récepteur minéralocorticoïde humain	18
Figure 2. Représentation schématique tridimensionnelle du RM selon ses trois régions principales	20
Figure 3. Schéma des résidus du RMh pouvant subir des modifications post-traductionnelles	21
Figure 4. Liaison des hormones corticostéroïdes à leurs récepteurs	22
Figure 5. Système rénine-angiotensine-aldostérone.....	23
Figure 6. Etude RALES : Probabilité de survie chez les patients insuffisants cardiaques sévères	32
Figure 7. Les différentes cibles du récepteur minéralocorticoïde.	38
Figure 8. Effets du RM sur l'épithélium du néphron distal	40
Figure 9. Schéma du modèle murin transgénique surexprimant le RMh spécifiquement dans les cardiomyocytes	52
Figure 10. Effet du torasémide sur l'expression rénale de la sous-unité α du canal épithélial sodique ENaC chez des souris soumises à un modèle d'activation minéralocorticoïde.....	69
Figure 11. Effet du torasémide sur l'expression cardiaque de gènes impliqués dans le remodelage matriciel	70
Figure 12. Effet du torasémide sur l'expression cardiaque des sous-unités de la NADPH oxydase.....	71
Figure 13. Immunolocalisation et quantification de Ki-67 sur des coupes de cœur de souris RM-Cardio traitées ou non à l'aldostérone	86
Figure 14. Immunolocalisation de la cavéoline-1 et du Ki-67 dans des coupes de cœur de souris RM-Cardio traitées à l'aldostérone.....	86
Figure 15. Expression cardiaque des gènes codant pour la cycline B1 et la Cdk1	87
Figure 16. Schéma représentant le mode d'action du microARN.....	89
Figure 17. Les microARNs 1941-5p, 215 et 298 sont les seuls microARNs surexprimés dans le cœur des souris RM-Cardio.....	90
Figure 18. Modulation de l'expression du miR-1941-5p dans le cœur de souris surexprimant dans le cardiomyocyte le RM ou le RG	91
Figure 19. Effet de modèles d'activation minéralocorticoïde sur l'expression cardiaque du miR-1941-5p	92
 Tableau 1. Séquences des amorces oligopeptidiques sens et antisens utilisées chez la souris pour réaliser les PCR quantitative.	58
Tableau 2. Paramètres physiologiques des souris soumis au modèle DOCA-Sel	68

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATION

Gravez B, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Clément K, Farman N, Jaisser F, Messaoudi S. Aldosterone Promotes Cardiac Endothelial Cells Proliferation *In Vivo*. J Am Heart Assoc. 2015 Jan 6;4(1). pii: e001266. doi: 10.1161/JAHA.114.001266.

Gravez B, Tarjus A, Jimenez-Canino R, El Moghrabi S, Messaoudi S, Alvarez de la Rosa D, Jaisser F. The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation In Cardiomyocytes. PLoS One. 2013; Sep 9;8(9):e73737. doi: 10.1371.

Gravez B, Tarjus A, Jaisser F. Mineralocorticoid receptor and cardiac arrhythmia. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2013; Jul 29. doi: 10.1111/1440-1681.12156.

Messaoudi S, **Gravez B**, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Launay JM, Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Clément K, Farman N, Jaisser F. Aldosterone-Specific Activation Of Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor *In Vivo*. Hypertension. 2013; Feb;61:361-367. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198986. Epub 2013 Jan 7.

COMMUNICATIONS ORALES

European Council for Cardiovascular Research, Nice 2013. “Aldosterone promotes cardiac endothelial cells proliferation and angiogenesis”.

Physiologie-Pharmacologie et Thérapeutique, Angers 2013. “New genes and biological processes regulated by aldosterone-mineralocorticoid receptor complex in the heart”.

COMMUNICATIONS ECRITES

European Council for Cardiovascular Research, Nice 2013; European Section of the Aldosterone Council, Paris 2013; ADMIRE COST meeting, Padova 2014. “The diuretic torasemide does not prevent aldosterone-mediated mineralocorticoid receptor activation in cardiomyocytes”.

Printemps de la cardiologie, Marseille 2013 et European Section of the Aldosterone Council, Hanovre 2012. “New genes and biological processes regulated by mineralocorticoid receptor-aldosterone complex in the heart”.

33ème journée de l’hypertension artérielle, Paris 2013. “Aldosterone promotes cardiac endothelial cells proliferation and angiogenesis”.

AVANT-PROPOS

L'hormone minéralocorticoïde aldostérone en se fixant à son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde, module la réabsorption de sodium au niveau du rein. La mise en évidence de l'expression du récepteur minéralocorticoïde dans d'autres tissus comme le cœur et les vaisseaux a permis un regard nouveau sur le rôle physiopathologique de l'aldostérone et de son récepteur. Plusieurs études cliniques ont déjà montré le bénéfice du blocage du récepteur minéralocorticoïde dans le traitement de patients atteints d'insuffisance cardiaque. Ces résultats encourageants, montrant une diminution significative de la mortalité chez les patients, ont suscité un regain d'intérêt pour le récepteur minéralocorticoïde. A ce jour, de nombreuses études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'importance du complexe aldostérone/récepteur minéralocorticoïde dans les processus de remodelage cardiovasculaire, et dans les phénomènes d'inflammation et de stress oxydatif. Cependant, les mécanismes d'actions impliqués dans les effets délétères de ce complexe, et plus particulièrement dans le système cardiovasculaire, ne sont que partiellement élucidés. Un élément essentiel de la complexité de cette signalisation minéralocorticoïde réside dans la capacité du récepteur à lier avec la même affinité deux types d'hormones : l'aldostérone et les glucocorticoïdes. Ces derniers étant beaucoup plus abondants dans la circulation générale, ils saturent le récepteur minéralocorticoïde. Néanmoins, un système de sélectivité du ligand existe, permettant à l'aldostérone d'activer son récepteur. Cependant, certaines cellules comme les cardiomyocytes, exprimant le récepteur minéralocorticoïde, ne possèdent pas ce mécanisme de sélectivité.

Mon travail de thèse a eu pour but d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de la signalisation du récepteur minéralocorticoïde cardiaque. Afin de mettre en évidence l'approche et l'intérêt des travaux réalisés au cours de ma thèse, je résumerai tout d'abord dans la première partie de l'introduction l'état actuel des connaissances sur le récepteur minéralocorticoïde et son importance en tant que cible potentielle thérapeutique. La seconde partie de l'introduction traitera plus particulièrement de l'implication du récepteur minéralocorticoïde dans la physiopathologie cardiaque.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

1.1 Les pathologies cardiovasculaires

L'étude de la santé des populations vise à améliorer la santé d'une population entière. Dans ce contexte, il est nécessaire d'appréhender l'évolution des facteurs influant sur celle-ci au cours du temps. L'une des conséquences mesurables de l'amélioration de l'état de santé des populations est le taux de mortalité et le poids que les maladies y représentent. Ces deux variables font l'objet de projections à long terme et permettent une bonne prédiction de l'état de santé mondial¹. A l'horizon 2030, l'espérance de vie dans le monde entier devrait encore augmenter par rapport à aujourd'hui. Alors que le taux de mortalité infantile va diminuer de près de 15%, celui des personnes adultes devrait augmenter significativement, surtout pour les classes d'âge supérieures à 70 ans. L'augmentation du taux de mortalité des personnes adultes malgré l'augmentation de l'espérance de vie et de la qualité de vie peut sembler contre-intuitive. En effet, le vieillissement de la population mondiale entraîne une susceptibilité de la population à contracter certaines pathologies, comme les pathologies cardiovasculaires. Actuellement, ces pathologies restent de mauvais pronostics et n'ont pas de thérapies optimales à cause de leurs propriétés multifactorielles. Elles représentent donc un problème majeur de santé publique dont la compréhension des mécanismes reste essentielle et toujours d'actualité.

Les pathologies cardiovasculaires, définies comme l'ensemble des troubles affectant le cœur et les vaisseaux, représentent 30% de la mortalité totale mondiale et environ 80% de la mortalité totale dans les pays industrialisés². Les principales atteintes cardiovasculaires sont les cardiopathies coronariennes (comme l'infarctus du myocarde), les artériopathies périphériques, les maladies cérébrovasculaires (comme l'accident vasculaire cérébral) et les malformations cardiaques congénitales. Les facteurs de risque qui leurs sont associés sont multiples. On peut notamment citer l'hypertension artérielle, le diabète et l'obésité, ainsi que le tabagisme ou la consommation régulière d'alcool. De nombreux mécanismes se mettent en place lors des pathologies cardiovasculaires, qui participent au développement et au maintien de celles-ci. Les mieux décrits sont le remodelage matriciel et électrophysiologique du cœur, le remodelage matriciel rénal, la dysfonction vasculaire, l'hypertension ou encore l'inflammation³. L'insuffisance cardiaque est une des évolutions possibles de ces maladies cardiovasculaires. On parle d'insuffisance cardiaque lorsque le cœur ne peut plus effectuer

correctement son travail de pompe. Il n'assure plus le débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes de l'organisme.

En 1990, le groupe de Brilla *et al.* a mis en évidence la présence de fibrose au niveau du ventricule droit chez des rats hypertendus suite à une surcharge minéralocorticoïde ⁴. La mise en place de fibrose est un élément important du remodelage de la matrice cardiaque. Elle se définit comme une augmentation de la concentration tissulaire en collagène, constituant majeur de la matrice extracellulaire, synthétisé et sécrété par les fibroblastes. Il existe cinq types différents de collagène dans le cœur, dont les collagènes I et III représentent 90% de la totalité. Jusqu'alors la fibrose cardiaque dans les modèles animaux d'hypertension n'était recherchée qu'au niveau du ventricule gauche hypertrophié subissant un remodelage consécutif à l'augmentation de la post-charge. L'observation du groupe de Brilla *et al.* a montré pour la première fois que la fibrose cardiaque n'est pas seulement induite par des facteurs hémodynamiques mais peut aussi être induite par des facteurs humoraux. Ainsi, le rôle des hormones circulantes a été plus spécifiquement étudié dans la mise en place du remodelage (concernant les vaisseaux et les organes). La même équipe a montré que l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), enzyme clé de la cascade minéralocorticoïde, réduit le remodelage matriciel et périvasculaire induit dans le cœur par le stress minéralocorticoïde⁵. Des travaux antérieurs identifiant l'expression du récepteur de l'aldostérone sur des fibroblastes isolés provenant d'aorte de rat⁶ confortent l'hypothèse selon laquelle des hormones peuvent influencer le remodelage cardiaque. Par la suite, d'autres études expérimentales se sont intéressées aux différents éléments de la cascade minéralocorticoïde, dont certains sont impliqués dans la mise en place et le maintien des pathologies cardiovasculaires. Parmi ceux-ci figurent l'aldostérone et son récepteur, à savoir le récepteur minéralocorticoïde (RM). Parallèlement, des études cliniques ont également montré des effets bénéfiques du blocage du RM sur la survie de patients atteints de pathologies cardiaques comme l'infarctus du myocarde ou l'insuffisance cardiaque. Dès lors, le complexe aldostérone/RM a été considéré comme une cible de choix dont l'activation pourrait expliquer la mise en place et le développement des pathologies cardiovasculaires. La suite de ce chapitre introductif se propose de résumer les données actuelles sur le RM dans le cœur, à travers la présentation des modèles expérimentaux et des essais cliniques ayant permis d'en comprendre sa structure, ses rôles et ses implications physiopathologiques.

1.2 Le récepteur minéralocorticoïde

1.2.1 Structure du gène codant pour le RM

Le RM appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, et plus précisément à la famille des récepteurs stéroïdiens (dont font partie également le récepteur aux androgènes, le récepteur glucocorticoïde (RG), le récepteur aux œstrogènes et le récepteur à la progestérone)⁷. Il agit comme un facteur de transcription dépendant des ligands. Le gène NR3C2 (pour *Nuclear Receptor sub-family 3 group C member 2*) codant pour le RM, est situé sur le chromosome 4 chez l'homme⁸. D'une taille approximative de 450 kilobases, il est composé de dix exons séparés les uns des autres par huit introns^{9, 10}. Les deux premiers exons 1 α et 1 β sont non-codants, les huit autres codent pour une protéine de 984 acides aminés. Ce gène est également retrouvé chez le rat et la souris, et sa structure est très conservée. Situé sur le chromosome 19 chez le rat, NR3C2 possède trois premiers exons non-codants (1 α , 1 β et 1 γ) et code pour une protéine de 981 acides aminés¹¹. Chez la souris, celui-ci est situé sur le chromosome 8 et code une protéine de 978 acides aminés¹². Une étude a montré que l'expression du gène codant pour le RM humain (RMh) est contrôlée par deux promoteurs alternatifs, menant à la synthèse d'une même protéine dans la mesure où le codon d'initiation de la traduction est situé dans le deuxième exon. P1 permet la transcription de l'exon 1 α et P2 celle de l'exon 1 β , générant alternativement deux isoformes d'acides ribonucléiques messagers¹³ (ARNm). Cette même étude indique que ces deux promoteurs sont soumis à des régulations hormonales distinctes. Bien que tous les deux soient sensibles aux glucocorticoïdes, seul P2 répond aux minéralocorticoïdes. Outre cette différence, P1 et P2 ont également des spécificités tissulaires bien distinctes. Alors que P1 est actif dans tous les tissus où le RM s'exprime, l'activité de P2 est 10 fois moins importante que celle de P1 et peut parfois être nulle comme dans le cerveau¹⁴. Des mutations du gène codant pour le RM ont également été décrites, notamment chez les patients atteints de pseudohypoaldostéronisme de type I. Ces derniers, qui montrent une résistance aux minéralocorticoïdes se définissant par une concentration plasmatique en potassium élevée (hyperkaliémie), une concentration plasmatique en aldostérone élevée (aldostéronémie) et une concentration plasmatique en sodium faible, peuvent présenter des mutations du gène codant pour le RM. Une dizaine de mutations ont été identifiées, particulièrement dans la région codant pour le domaine de liaison du ligand hormonal, donnant une protéine avec une activité transcriptionnelle diminuée par rapport aux sujets sains^{15, 16}.

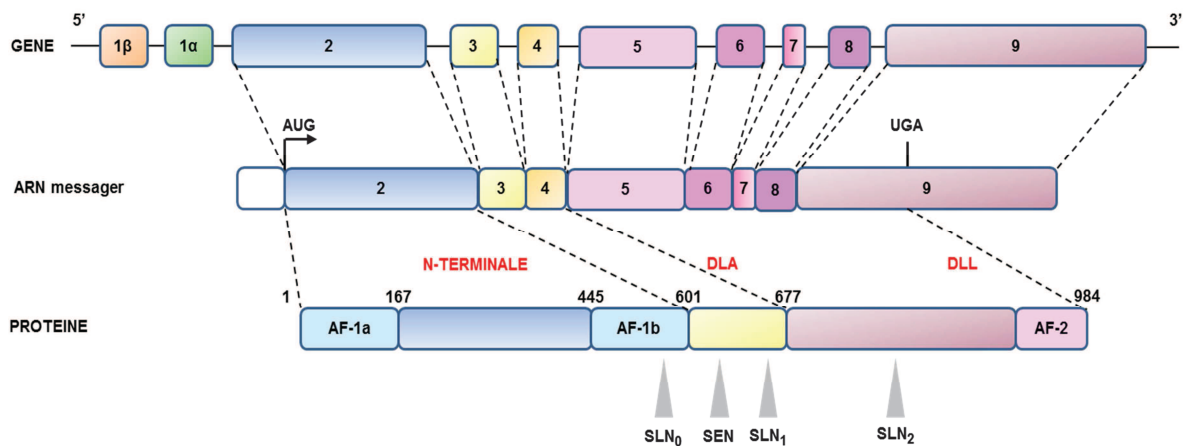


Figure 1. Schéma de la structure du récepteur minéralocorticoïde humain. Le gène, l'ARN messenger et la protéine sont représentés. Le gène codant pour le RMh est composé de dix exons dont les deux premiers ne sont pas traduits (1α et 1β). Le codon d'initiation de la traduction AUG est situé 2 paires de bases après le début de l'exon 2, tandis que le codon stop est localisé sur l'exon 9. Le récepteur contient des domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle (AF-1a, AF-1b et AF-2), des signaux de localisation nucléaire (SLN₀, SLN₁ et SLN₂) et un signal d'export nucléaire (SEN). N-TERMINALE: région N-terminale; DLA: domaine de liaison à l'acide désoxyribonucléique; DLL: domaine de liaison du ligand hormonal. (D'après Viengchareun *et al.*, Nucl Recept Signal, 2007).

Il a été montré également que le gène NR3C2 possède des polymorphismes, concernant un seul nucléotide, situés dans les exons (polymorphismes codants des variants de la protéine) ou dans les régions non traduites du gène (polymorphismes ne modifiant pas la protéine). Certains polymorphismes chez l'homme ont été associés à des risques de développement de maladies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'infarctus du myocarde¹⁷. Ainsi, le polymorphisme *rs5522* (A/G) n'induit pas de changement de l'expression du RM¹⁸. Par contre, il a été montré que les sujets portant l'allèle G présentent moins de risque de développer une hypertension artérielle chronique que ceux portant l'allèle A¹⁹. Une autre étude a montré que la diminution de la pression artérielle en réponse à l'ECA est moins importante chez des sujets hypertendus portant l'allèle G que chez ceux portant l'allèle A¹⁷. Le polymorphisme de nomenclature *rs2070951* (G/C) a également été étudié lors de cette étude. Il est rapporté que les patients portant l'allèle G traités à l'ECA présentent une diminution importante mais non significative de leur pression artérielle par rapport à ceux portant l'allèle C¹⁷. De plus, les patients portant l'allèle G montrent une expression diminuée du RM *in vitro*^{18, 20} et une augmentation de la pression artérielle et de l'aldostéronémie *in vivo*²⁰ par rapport à ceux portant l'allèle C. Le polymorphisme *rs5534* (A/G) du gène NR3C2

est associé au risque de survenue d'infarctus du myocarde. En effet, des sujets présentant l'allèle A ont moins de risque de survenue d'infarctus du myocarde que ceux présentant l'allèle G²¹. Un autre polymorphisme, le S810L, est quant à lui gain de fonction. En effet, le remplacement d'une sérine par une leucine en position 810 altère la spécificité du RM pour l'aldostérone et les glucocorticoïdes, permettant ainsi à d'autres hormones stéroïdes de s'y lier et de l'activer²². Ces différents polymorphismes, en permettant de donner soit une protéine différente, soit la même protéine avec des propriétés différentes, permettraient d'expliquer en partie les différences dans le développement de pathologies cardiovasculaires d'un individu à l'autre. Ces études restent cependant à approfondir.

1.2.2 Structure du RM

Comme tous les autres récepteurs nucléaires, le RM est organisé selon plusieurs domaines qui se distinguent en termes de structure et de fonction. Ces domaines sont regroupés selon trois régions principales, définies de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la manière suivante^{12, 23, 24} :

- la région N-terminale contenant les domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle
- la région centrale qui est constituée du domaine de liaison à l'acide désoxyribonucléique (ADN ; DLA)
- la région C-terminale contenant le domaine de liaison du ligand hormonal (DLL).

Ces différents domaines vont permettre au RM d'agir comme un facteur de transcription dépendant des ligands; tout d'abord par sa liaison à son ligand, puis par sa liaison au gène cible et enfin par sa liaison aux corégulateurs de son activité. Plusieurs motifs s'ajoutent aux différents domaines pour réguler la fonction du RM. Dans la région N-terminale, contenant les domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle du RM (AF-1a et AF-1b, pour *Activation Function 1a et 1b*)²⁵, un signal de localisation nucléaire (SLN) est inclus dans le domaine AF-1b. Des SLN sont également présents dans le DLA et le DLL. Le DLA est constitué de deux motifs en doigts de zinc, nécessaires à la liaison du RM à ses éléments de réponse hormonale au niveau de l'ADN ainsi qu'à sa dimérisation²⁶. Il possède également un motif de signalisation d'export nucléaire (SEN). Au niveau du DLL, il a été montré que des protéines de choc thermique (HSP, pour *Heat Shock Protein*), y interagissent. Ces HSP permettent de maintenir le RM dans une conformation permettant sa liaison avec

son ligand hormonal tout en masquant le SLN situé dans ce domaine. Un domaine de régulation de l'activité transcriptionnelle du RM AF-2 y est également présent.

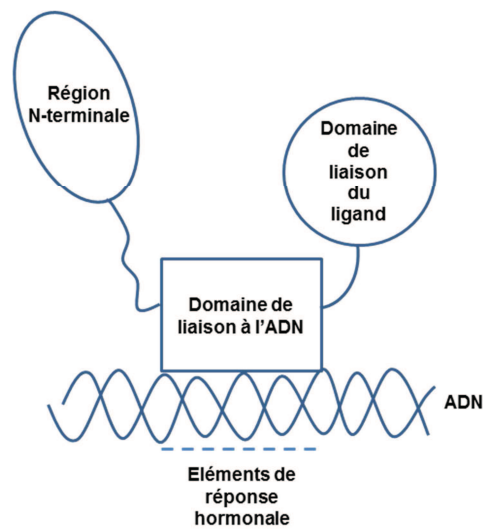


Figure 2. Représentation schématique tridimensionnelle du RM selon ses trois régions principales. La région N-terminale contenant les domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle; la région centrale constituée du domaine de liaison à l'acide désoxyribonucléique; la région C-terminale contenant le domaine de liaison du ligand hormonal.

Le RM peut subir des modifications post-traductionnelles qui permettent de modifier son activité et ainsi de réguler la physiopathologie cellulaire. Les mieux décrites sont la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation ou encore l'acétylation²⁷. Celles-ci peuvent agir sur sa dimérisation, sa capacité à se lier à l'ADN ou encore sur le recrutement de ses corégulateurs transcriptionnels. Ainsi, dans les neurones de rat, le RM est phosphorylé sur certains de ses résidus sérine et thréonine *via* la kinase dépendante des cyclines de type 5 (Cdk5, pour *Cyclin-dependent kinase 5*)²⁸. Cette kinase phosphoryle ses résidus cibles au niveau de la région N-terminale du RM induisant une baisse de l'activité transcriptionnelle du RM sans pour autant interférer avec sa translocation nucléaire. Une thréonine et une sérine, toutes deux situées dans le DLL et identifiées par analyse protéomique comme des sites potentiels de phosphorylation pourraient être impliquées dans des modifications de la conformation de ce domaine²⁹. De la même manière, 16 sérines ont été montrées en 2013 comme étant des cibles de phosphorylation. Parmi elles, une sérine présente dans le DLL empêche la liaison du RM à son ligand³⁰. La tyrosine en position 73 de la région N-terminale a été montrée comme un site potentiel de phosphorylation, même si peu de résidus tyrosine

sont phosphorylés dans le RM³¹. D'ailleurs, il a été montré qu'une concentration basse d'aldostérone (1 nM) augmente seulement la phosphorylation de résidus sérine, alors qu'une concentration plus forte de 10 nM induit également la phosphorylation de résidus thréonine, alors qu'aucune de ces concentrations n'a d'effet sur les résidus tyrosines³². L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés qui, en se fixant à ses protéines cibles, les entraîne vers le protéasome où elles seront dégradées. Le RM est mono-ubiquitiné en condition physiologique alors que l'activation par l'aldostérone induit sa poly-ubiquitination et sa dégradation. Une étude a montré que ces différents états d'ubiquitination sont assurés par la kinase ERK1/2 (pour *extracellular-regulated kinase1/2*)³³. Ce mécanisme semble être essentiel à la régulation de l'activation transcriptionnelle du RM. Les petites protéines SUMOs (pour *Small Ubiquitin-related MOdifiers*), similaires à l'ubiquitine, peuvent également se lier à certains résidus lysine du RM, surtout dans sa région N-terminale. Ainsi, des études ont montré que la sumoylation diminuait l'activité transcriptionnelle du RM³⁴ alors que d'autres indiquent qu'elle permet le recrutement de certains des co-activateurs du RM³⁵. Une autre modification post-traductionnelle du RM développée ici est l'acétylation. Ce groupement acétyle peut rendre compte de l'inhibition de l'activité du RM. En effet, l'augmentation de la pression artérielle induite par une surcharge minéralocorticoïde chez le rat est inhibée par l'ajout d'un bloqueur des enzymes histones désacétylases³⁶. La régulation du degré d'acétylation du RM semble donc indispensable pour contrôler l'activité du récepteur. Cependant le contexte cellulaire entraînant ces modifications est encore méconnu.

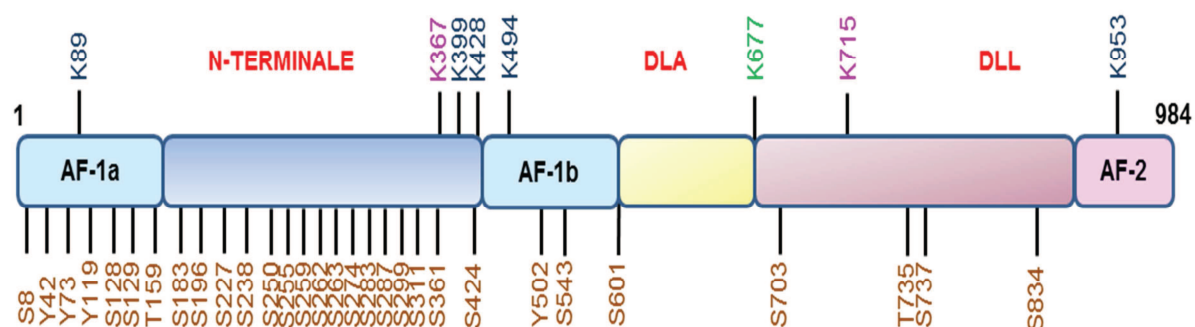


Figure 3. Schéma des résidus du RMh pouvant subir des modifications post-traductionnelles. Sites de phosphorylation; sites d'ubiquitination; sites de sumoylation; sites d'acétylation; AF-1a, AF-1b et AF-2 : domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle; N-TERMINALE: région N-terminale; DLA: domaine de liaison à l'ADN; DLL: domaine de liaison du ligand hormonal (D'après Faresse *et al.*, J Steroid Biochem Mol Biol, 2014).

1.2.3 Ligands du RM

Ce récepteur tire son nom de l'hormone minéralocorticoïde aldostérone qu'il lie. Néanmoins, le RM est capable de lier également les glucocorticoïdes, qui forment avec les minéralocorticoïdes, les hormones corticostéroïdes. En effet, la liaison du RM avec ces deux hormones est de même affinité²⁶. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au cours de ce travail de thèse à la liaison entre le RM et son ligand le plus anciennement étudié, l'aldostérone.

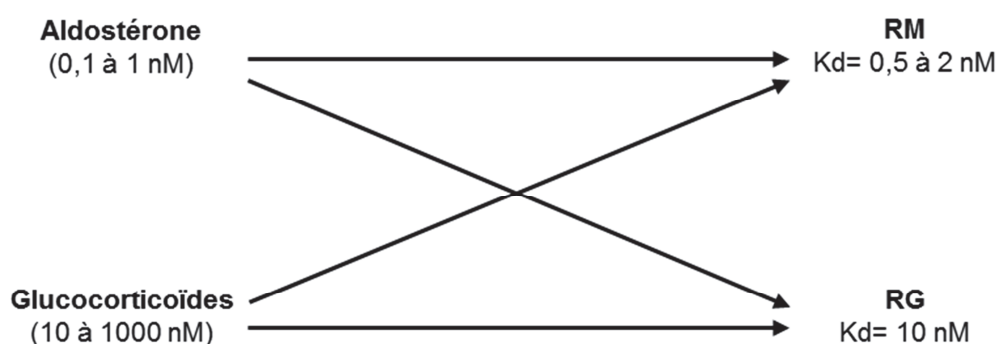


Figure 4. Liaison des hormones corticostéroïdes à leurs récepteurs. Le RM a la même affinité pour l'aldostérone et les glucocorticoïdes; le RG a aussi une affinité équivalente pour ces hormones. Les concentrations plasmatiques physiologiques sont indiquées ainsi que les constantes de dissociation des hormones pour leurs ligands (K_d , pour *dissociation constant*).

1.2.3.1 Hormone minéralocorticoïde aldostérone

L'aldostérone³⁷ est le dernier effecteur du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), qui une fois lié à son récepteur, permet de maintenir l'homéostasie sodique au niveau rénal. Le SRAA joue donc un rôle central dans le contrôle de la pression artérielle, de la perfusion tissulaire, de la volémie (régulation du volume extracellulaire) et de la balance hydrosodée. Il est constitué d'une suite d'oligopeptides clivés les uns après les autres grâce à une cascade enzymatique ayant lieu dans le compartiment sanguin. Tout d'abord la rénine, synthétisée au niveau du rein, va cliver l'angiotensinogène hépatique en angiotensine I. Cette dernière va donner naissance à l'angiotensine II *via* l'ECA, protéase exprimée dans tous les lits vasculaires de l'organisme³⁸. L'angiotensine II, un vasoconstricteur puissant, stimule la synthèse d'aldostérone en se liant à ses récepteurs présents au niveau de la glande surrénale³⁹. Sécrétée dans la circulation sanguine, l'aldostérone se lie, au niveau de ses tissus cibles, à son

récepteur et l'active. Le RM joue alors son rôle de facteur de transcription en induisant l'expression de ses gènes cibles, qui font partie de la dernière étape d'activation du SRAA.

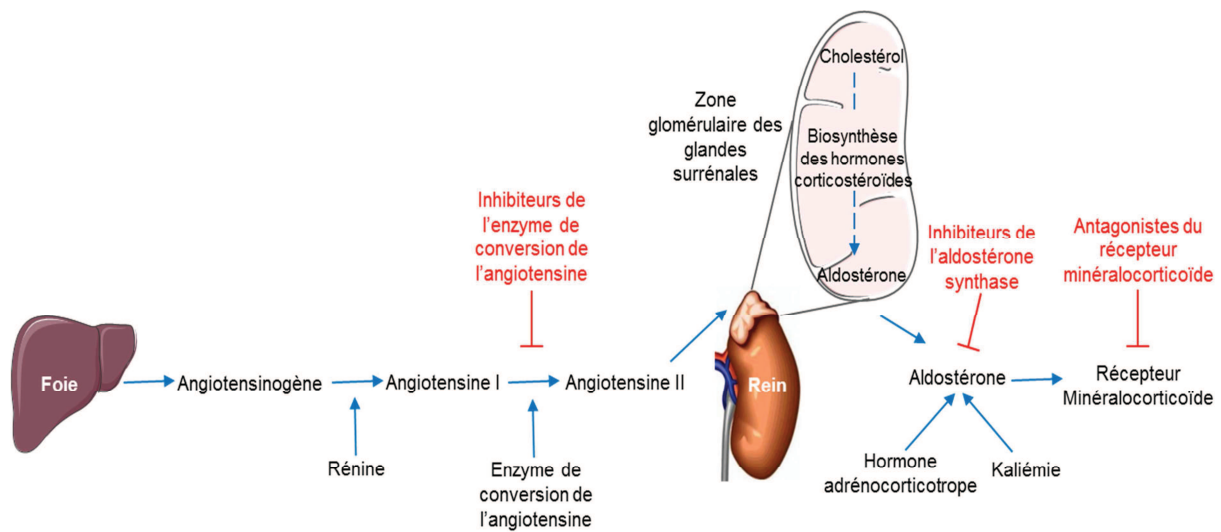


Figure 5. Système rénine-angiotensine-aldostérone. L'angiotensinogène, synthétisé au niveau du foie, est clivé par la rénine pour donner l'angiotensine I. Cette dernière est clivée à son tour par l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour donner l'angiotensine II. L'angiotensine II, un vasoconstricteur puissant, va stimuler la synthèse d'aldostérone en se liant à ses récepteurs au niveau de la glande surrénale. L'aldostérone sécrétée va pouvoir se lier au récepteur minéralocorticoïde. Les flèches bleues sont activatrices, les rouges sont inhibitrices.

Suite à leur activation par l'angiotensine II, les glandes surrénales sont le lieu de synthèse de l'aldostérone. Comme toutes les hormones stéroïdiennes, l'aldostérone est produite dans le cortex surrénalien⁴⁰ (ou glande corticosurrénale), plus particulièrement dans sa zone glomérulaire⁴¹. Sa biosynthèse est effectuée à partir du cholestérol et se compose d'une cascade réactionnelle nécessitant quatre enzymes distinctes. L'aldostérone induit au niveau du néphron distal (à savoir le tubule contourné distal et le canal collecteur) la réabsorption du sodium de l'urine primitive vers le milieu intérieur, cette étape étant finement régulée. L'eau est également réabsorbée de façon passive en suivant le gradient de sodium, ce qui maintient constant les volumes extracellulaires, en particulier le volume plasmatique et donc la pression artérielle. Toute perte de volume, comme les hémorragies, les vomissements, les diarrhées, les sudations excessives ou un manque d'apport alimentaire en sel, provoque une stimulation de la synthèse et de la sécrétion d'aldostérone. En revanche, l'état

d'apesanteur ou bien l'immersion complète de l'organisme sont accompagnés d'une baisse de sa concentration plasmatique.

Les principaux acteurs de la régulation de l'aldostérone sont la concentration plasmatique en potassium (kaliémie), l'angiotensine II et l'hormone adrénocorticotrope (ACTH, pour *adrenocorticotropic hormone*) dont les mécanismes d'action sont développés ci-après :

- la kaliémie : le potassium est un puissant stimulant de la synthèse et de la sécrétion d'aldostérone. L'augmentation de sa concentration plasmatique va agir directement sur la zone glomérulaire⁴² des glandes surrénales qui vont produire en réponse de l'aldostérone. L'action de cette dernière va permettre en retour d'excréter du potassium dans les urines et donc de maintenir l'homéostasie potassique, créant ainsi une boucle de contrôle. L'augmentation de la kaliémie va induire la dépolarisation de la membrane plasmique des cellules de la zone glomérulaire, conduisant à une entrée de calcium *via* les canaux de type L et T⁴³. Cette entrée de calcium intracellulaire va entraîner l'augmentation d'expression du gène CYP11B2, codant pour la dernière enzyme de la cascade de synthèse de l'aldostérone, l'aldostérone synthase, comme le montre l'utilisation d'un agoniste des canaux calciques sur des cellules H295R provenant de carcinome surrénalien humain⁴⁴. La calmoduline et les calmodulines kinases I et IV sont les intermédiaires de cette signalisation. Il a été montré dans des cellules H295R contenant le promoteur du gène CYP11B2 que l'inhibition de la calmoduline et des calmodulines kinases I et IV empêche la transcription de ce gène⁴⁵. Le potassium pourrait ainsi permettre l'entrée de calcium dans les cellules de la zone glomérulaire des glandes surrénales, induisant l'activation de la calmoduline et des calmodulines kinases I et IV⁴⁵. Finalement, ces dernières activent des facteurs de transcription modulant positivement l'expression de CYP11B2 et donc la synthèse d'aldostérone⁴⁵.

- l'angiotensine II : comme décrit précédemment, cette hormone stimule la synthèse d'aldostérone en induisant l'augmentation de l'expression de l'aldostérone synthase dans les cellules de la zone glomérulaire des glandes surrénales³⁹. En effet, l'angiotensine II, comme le potassium, peut induire l'augmentation de l'expression de CYP11B2 dans les cellules H295R⁴⁴. L'angiotensine II agit en activant plusieurs voies de signalisation différentes, *via* son récepteur AT1. L'inhibition de la voie de signalisation des *src* kinases bloque la synthèse d'aldostérone dans les cellules H295R, montrant que l'action de l'angiotensine II sur l'aldostérone dépend de ces tyrosines kinases cytoplasmiques⁴⁶. Il a été aussi montré, dans ces mêmes cellules, que les voies de signalisation de la calmoduline et des *src* kinases, après activation par AT1, induisent une augmentation d'expression de l'aldostérone synthase⁴⁷.

L'inhibition spécifique de ces voies empêche directement ou indirectement l'expression de l'aldostérone synthase par l'intermédiaire de l'inhibition de facteurs de transcription du gène CYP11B2⁴⁸ (faisant partie de la superfamille des récepteurs nucléaires induit par les facteurs de croissance neuronaux ou NGFI, pour *nuclear receptor superfamily/nerve growth factor-induced*). L'angiotensine II peut également réguler l'expression de la phospholipase C- β ⁴⁹. En effet, l'angiotensine II va activer la protéine Gq, qui active à son tour la phospholipase C- β , qui à son tour clive le phospho-inositol biphosphate en diacyl-glycérol et en inositol triphosphate⁵⁰. Ce dernier induit l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium en induisant l'efflux du calcium du réticulum endoplasmique. Le calcium active la voie de signalisation de la calmoduline conduisant à l'augmentation de l'expression du gène CYP11B2^{49, 50}. Ces deux acteurs de la régulation de l'aldostérone sont interdépendants, car la production d'aldostérone en réponse à l'angiotensine II dépend de la kaliémie.

- l'hormone adrénocorticotrope : cette hormone effectrice de l'axe hypothalamo-hypophysaire peut contribuer, dans une moindre mesure, à la régulation de la synthèse d'aldostérone. Cependant, son rôle reste encore obscur, comme le montrent ses effets opposés sur la synthèse d'aldostérone dans des études chez le rat. En effet, une administration aiguë d'ACTH augmente la production d'aldostérone⁵¹ alors que de l'ACTH donnée chroniquement diminue la concentration plasmatique de cette hormone^{52, 53}. Malgré ces résultats contradictoires, il est actuellement admis que l'ACTH joue un rôle dans la régulation de la production d'aldostérone chez l'homme. En effet, les mutations du récepteur MC2R de l'ACTH entraînent chez les patients des troubles dans la régulation de la balance hydrosodée⁵⁴.

Plus récemment, l'étude des tumeurs de la glande surrénale a permis de mettre en évidence une régulation pathologique de l'aldostérone. Environ 30 à 60% de ces tumeurs présentent une mutation au niveau du gène KCNJ5 codant pour le canal potassique Kir3.4, pour *Inward rectifying K⁺ channel*. Avec Kir3.1 codé par KCNJ3, il forme un complexe qui est exprimé dans les cellules de la zone glomérulaire de la glande surrénale, permettant de maintenir leur potentiel membranaire. Une mutation spécifique du gène KCNJ5 induit une surexpression de l'aldostérone synthase et donc augmente la production d'aldostérone⁵⁵. Dans ces mêmes tumeurs, des mutations entraînant des pertes de fonction ont également été décrites. Une mutation du gène ATP1A1 codant pour la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe ionique ATPasique sodium/potassium diminue l'affinité du potassium pour la pompe⁵⁶. Il en résulte une dépolarisation de la cellule permettant la surexpression de l'aldostérone synthase et donc l'augmentation de l'aldostéronémie⁵⁷.

1.2.3.2 Hormones glucocorticoïdes

Les hormones glucocorticoïdes sont les hormones stéroïdes majeures de l'organisme et possèdent des propriétés anti-inflammatoires. A l'instar de l'aldostérone, elles sont synthétisées à partir du cholestérol, dans la zone fasciculaire et réticulaire du cortex surrénalien. Elles sont principalement représentées par le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez les rongeurs. Les glucocorticoïdes se lient à leur récepteur spécifique le RG, exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme. Ils peuvent également induire des voies de signalisation différentes à travers leur fixation au RM. Cette propriété du RM à lier ces deux hormones doit être prise en compte dans la compréhension de la signalisation minéralocorticoïde. Plusieurs travaux se sont intéressés à l'effet des glucocorticoïdes sur le complexe aldostérone/RM dans le cœur. Des rats soumis à une surcharge minéralocorticoïde présentent au niveau du cœur une augmentation de la fibrose ainsi que des niveaux d'expression de marqueurs d'inflammation (comme la cyclo-oxygénase-2 ou l'ostéopontine) et de stress oxydatif (comme les sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase sous forme réduite ou NADPH oxydase, pour *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)⁵⁸. Quatre semaines après l'arrêt de la stimulation minéralocorticoïde les augmentations des niveaux d'expression des marqueurs cités ci-dessus sont toujours observées, suggérant un effet minéralocorticoïde dépendant des glucocorticoïdes, majoritaires dans le plasma par rapport à l'aldostérone⁵⁸. Une autre étude, découlant de la précédente, a montré que l'augmentation des niveaux d'expression de marqueurs d'inflammation et de stress oxydatif est prévenue par le blocage du RM, et non pas du RG, et que l'action des glucocorticoïdes sur le RM semble dépendre du stress oxydatif environnant⁵⁹.

La compilation de ces résultats démontre les multiples signalisations possibles induites par le RM au regard de sa liaison avec l'un ou l'autre de ces corticostéroïdes. La suite de cette introduction se propose de montrer la complexité de la signalisation minéralocorticoïde cardiaque selon son activation par l'aldostérone ou par les glucocorticoïdes.

1.2.3.3 Sélectivité de liaison de l'aldostérone au RM

Les glucocorticoïdes se lient avec la même affinité que l'aldostérone au RM et leur concentration plasmatique étant 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'aldostérone, les glucocorticoïdes devraient se lier au RM de manière prédominante. Pour permettre à

l'aldostérone de se lier à son récepteur, il existe donc des mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde qui ont été identifiés.

1.2.3.3.1 Sélectivité enzymatique : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2

Le mécanisme majeur repose sur l'activité de l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2). Elle est connue pour empêcher la liaison du cortisol ou de la corticostérone au RM et permet ainsi à l'aldostérone de s'y lier et d'induire ses propres voies de signalisation⁶⁰. Exprimée dans certaines cellules cibles de l'aldostérone, elle convertit chez l'homme le cortisol en cortisone, métabolite de faible affinité pour le RM⁶¹⁻⁶³ (chez les rongeurs, elle convertit la corticostérone en 11-déshydrocorticostérone). En revanche, la 11 β -HSD2 est sans effet sur l'aldostérone. La co-expression de la 11 β -HSD2 et du RM dans la cellule est donc nécessaire pour empêcher la compétition entre les ligands. Elle permet ainsi à l'aldostérone de se fixer au RM, malgré une concentration supérieure en glucocorticoïdes⁶⁴. Néanmoins, un certain nombre de cellules exprimant le RM présente peu d'expression de la 11 β -HSD2. C'est le cas par exemple du kératinocyte et du cardiomyocyte⁶⁵, où la question de la nature du ligand effectivement responsable de l'activation du RM se pose. De nombreux travaux ont été entrepris dans le but de comprendre si cette absence de co-expression empêche l'aldostérone de se lier à son récepteur dans les cellules concernées. La suite de ce chapitre se propose de résumer les expériences effectuées à ce jour au niveau du cœur, pour appréhender cette question qui a été au centre de mon projet de thèse.

Des équipes ont analysé les gènes régulés par le complexe aldostérone/RM dans le cœur^{66, 67}. Dans une étude de 2007, une lignée cellulaire de cardiomyocytes H9C2-RM⁺ dérivée de ventricules embryonnaires de rat et transfectée avec le RM, a été traitée avec de l'aldostérone⁶⁸. L'analyse du transcriptome par puces à oligonucléotides a permis d'identifier plusieurs gènes rapidement et directement induits par l'aldostérone et impliqués dans des phénomènes de remodelage cardiaque ou encore d'inflammation⁶⁸. Ces travaux ont concerné des gènes précocement induits par l'hormone minéralocorticoïde. Notre laboratoire s'est, quant à lui, focalisé sur la régulation à long terme effectuée par le couple aldostérone/RM *in vivo*. En utilisant des souris surexprimant spécifiquement le RM ou le RG dans le cardiomyocyte, notre équipe a montré que ces deux récepteurs induisaient l'augmentation ou la diminution d'expression d'un nombre restreint de gènes (comme la lipocaline 2 ou la

protéine profibrosante inhibitrice de l'activateur du plasminogène de type 1 ou PAI-1, pour *plasminogen activator inhibitor-1*)⁶⁹. Ces gènes sont aussi impliqués dans le remodelage cardiaque, l'inflammation et le tonus vasculaire. Pour approfondir l'exploration de la signalisation et des mécanismes moléculaires du complexe aldostérone/RM dans le cœur, nous avons effectué l'étude par puces à oligonucléotides de transcriptome cardiaque de souris surexprimant spécifiquement le RMh dans les cardiomyocytes (RM-Cardio). Les souris RM-Cardio ont été traitées à l'aldostérone ou aux glucocorticoïdes pendant une semaine. Cette approche nous a permis de mettre en évidence dans le cardiomyocyte des gènes spécifiquement modulés par l'aldostérone ou les glucocorticoïdes *via* le RM⁷⁰. Ce travail a été publié et sera présenté dans la partie résultats et discussions (*confer* chapitre 3.2).

1.2.3.3.2 Autres mécanismes de sélectivité de l'aldostérone au RM

L'absence de la 11 β -HSD2 n'empêche donc pas, dans le cardiomyocyte, une voie de signalisation du RM aldostérone dépendante. Par conséquent, cela suggère fortement qu'il existe d'autres mécanismes de sélectivité du RM pour son ligand, qui restent à définir.

La grande majorité des glucocorticoïdes circulants sont associés à des protéines. La transcortine est responsable du transport de 80 à 95% d'entre eux, l'albumine se chargeant de la fraction restante⁷¹. Des souris invalidées pour le gène codant pour la transcortine apparaissent résistantes à l'action de l'aldostérone. En effet, en réponse à un régime pauvre en sel, l'aldostéronémie est augmentée mais pas l'expression du canal épithélial sodique (ENaC pour *epithelial sodium channel*), gène cible du complexe aldostérone/RM dans le rein, par rapport aux souris sauvages. Ces résultats suggèrent une fonction intrinsèque de la transcortine permettant aux hormones corticostéroïdes d'agir sur leurs cibles tissulaires⁷², cependant le mécanisme précis selon lequel la transcortine module la sélectivité minéralocorticoïde reste inconnu. Il a déjà été envisagé qu'un autre type de transporteur, membranaire, pourrait exporter spécifiquement les glucocorticoïdes hors de la cellule pour réduire leur concentration cytoplasmique⁷³. Par ailleurs, le RM peut par lui-même être un acteur de sa sélectivité pour le ligand. En effet, l'aldostérone se dissocie plus lentement du RM que les glucocorticoïdes. Le complexe aldostérone/RM ayant une plus grande stabilité, il pourrait donc être favorisé dans certaines cellules⁷⁴. Sa dimérisation intervient également, dans la mesure où le RM peut agir sous forme d'homodimères ou bien d'hétérodimères avec le RG⁷⁵ et faciliter dans l'une des conformations sa liaison à l'aldostérone⁷⁵. Finalement, un

point essentiel de la sélectivité du RM pour l'aldostérone est sa synthèse extra-surrénalienne, comme cela a été décrit dans le cerveau du rat⁷⁶, de l'homme⁷⁷ ou dans le cœur⁷⁸⁻⁸⁰. L'aldostérone synthase est en effet exprimée dans le cœur de rats adultes⁷⁸, dans le cœur humain fœtal⁷⁹ et dans le cœur humain pathologique⁸⁰. La synthèse locale d'aldostérone dans le cœur pourrait ainsi augmenter la fraction de RM liée à cette hormone.

Malgré ces autres mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde, l'importance de la 11 β -HSD2 est illustrée en pathologie. Les patients atteints du syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes, provoqué par des mutations inactivatrices de la 11 β -HSD2, présentent une hypertension sévère, une hypokaliémie et une alcalose, alors que leur aldostéronémie est très basse⁸¹⁻⁸³. La cause de cette maladie est l'activation permanente et inappropriée du RM par les glucocorticoïdes. L'implication du récepteur a été démontrée par l'utilisation d'un de ses antagonistes pharmacologiques, la spironolactone, qui améliore la survie des patients⁸⁴.

1.3 Bénéfices de l'inhibition du récepteur minéralocorticoïde en clinique

1.3.1 Antagonistes pharmacologiques du RM

Aujourd'hui, les antagonistes du RM sont associés aux autres thérapies dans le traitement de certaines pathologies cardiovasculaires⁸⁵. En effet, le premier effet bénéfique rapporté de ceux-ci est leur capacité à diminuer la pression artérielle⁸⁶. Cette propriété hypotensive de l'antagonisme du RM s'explique en partie par le blocage de la réabsorption rénale de sodium et la diminution de la volémie. De plus, l'inhibition du RM en clinique présente des avantages thérapeutiques y compris à des doses ne modifiant pas la pression artérielle⁸⁵. A ce jour, les antagonistes utilisés sont la spironolactone et l'éplérénone, des antagonistes stéroïdiens présentant les mêmes effets thérapeutiques mais des caractéristiques différentes. Leur principal effet secondaire potentiellement dangereux est l'augmentation de la kaliémie, qui lorsqu'elle est trop importante peut entraîner des troubles du rythme cardiaque. En effet, la réabsorption rénale de sodium induite par le RM est associée à une excrétion de potassium. Donc, le blocage du RM augmente la concentration plasmatique en potassium. Ainsi, l'utilisation de ces antagonistes nécessite d'une part une bonne sélection des patients et d'autre part un suivi de la kaliémie^{87, 88}.

La spironolactone, un antagoniste dit de première génération, est rapidement métabolisée par le foie et exerce ses effets par l'intermédiaire de ses métabolites actifs,

majoritairement le 7 α -thiométhyl-spirolactone et la canrénone^{88, 89}. La spironolactone est peu sélective et peut se lier, en plus du RM, aux récepteurs aux androgènes et à la progestérone, entraînant certains effets secondaires indésirables. Chez l'homme, la spironolactone peut être cause de gynécomastie et d'impuissance, alors que la femme peut être sujette à des troubles du cycle menstruel⁹⁰.

L'éplérénone, dit de deuxième génération, est beaucoup plus sélectif que la spironolactone dans la mesure où il ne se lie qu'au RM⁹¹. C'est pourquoi il est bien toléré en clinique, comme le montre la fréquence de survenue d'effets indésirables qui est du niveau de celle observée chez les patients traités avec un placebo⁹². Par contre, son affinité est 100 à 500 fois plus faible que celle de la spironolactone pour le RM⁹¹.

D'autres antagonistes sont maintenant disponibles, mais encore utilisés dans le cadre d'études expérimentales, comme le RU28318⁹³ ou le canrénoate de potassium⁹⁴, un dérivé de la spironolactone soluble dans l'eau. Ces molécules, pour bloquer efficacement le RM, sont classiquement utilisées à des concentrations 100 fois plus importantes que l'aldostérone.

1.3.2 Effets de l'antagonisme du RM dans l'hypertension

La spironolactone a été le premier antagoniste du RM à être utilisé en clinique. En 1966, une étude clinique a montré sa capacité à réduire la pression artérielle chez des patients hypertendus⁸⁶. Elle est également efficace dans le traitement de l'hypertension résistante, à savoir chez des patients qui ne répondent pas à certains traitements anti-hypertensifs comme les bloqueurs des canaux calciques (étude ASCOT-BPLA, pour *Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm*)⁹⁰. L'éplérénone est également un hypotenseur. Il est en effet aussi efficace que les bloqueurs des canaux calciques⁹⁵, les inhibiteurs de l'ECA⁹⁶, les bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine II⁹⁷ ou la spironolactone⁹².

1.3.3 Effets de l'antagonisme du RM dans l'insuffisance cardiaque

1.3.3.1 Phénomène d'échappement de l'aldostérone

L'utilisation des antagonistes du RM à des fins autres qu'hypotensives a été mise en évidence par le phénomène d'échappement de l'aldostérone. Ce dernier correspond au retour à la

normale, voire à l'augmentation, de l'aldostéronémie rapidement après sa baisse suite à l'inhibition du SRAA. En effet, après infarctus du myocarde, les patients traités avec un inhibiteur de l'ECA voient leur aldostéronémie et leur pression systolique ré-augmenter au bout de quatre jours⁹⁸. Une autre étude a montré que l'inhibition de l'ECA chez des patients insuffisants cardiaques n'empêchait pas la ré-augmentation de l'aldostéronémie au bout de 43 semaines de traitement⁹⁹. Ce phénomène d'échappement de l'aldostérone lors du blocage du SRAA est impliqué dans les pathologies cardiovasculaires. Ainsi, l'étude clinique SAVE (pour *Survival And Ventricular Enlargement*) a observé que la concentration plasmatique en aldostérone est corrélée au pronostic vital des patients souffrant de dysfonction ventriculaire gauche consécutive à un infarctus du myocarde¹⁰⁰. En effet, les patients ne présentant pas d'évènements cardiovasculaires pendant les deux ans suivant le début de l'étude ont une aldostéronémie plus basse que les patients qui décèdent, ou développent une insuffisance cardiaque sévère ou une combinaison de complications cardiovasculaires pendant la durée de l'étude¹⁰⁰. Une autre étude (CONSENSUS, pour *COoperative North Scandivian ENalapril SURvival Study*) effectuée sur des patients en insuffisance cardiaque a mis en évidence une corrélation positive entre l'aldostéronémie et le taux de mortalité au cours du traitement¹⁰¹.

A la lumière de ces résultats et de cette nouvelle notion d'échappement de l'aldostérone sous blocage de l'ECA, l'intérêt d'une utilisation clinique du blocage du RM a émergé. A la fin des années 1990, de grands essais cliniques ont démontré l'efficacité des antagonistes du RM dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. L'importance de leurs résultats dans la compréhension de l'implication du RM en physiopathologie cardiovasculaire est présentée ci-dessous.

1.3.3.2 Etude RALES

La première étude clinique à démontrer de manière probante que le blocage du RM améliore le traitement de l'insuffisance cardiaque a été l'étude RALES (pour *Randomized ALdactone Evaluation Study*) en 1999¹⁰². Les patients inclus étaient atteints d'insuffisance cardiaque grave de stade III et IV selon la classification de l'association New-Yorkaise du cœur (qui compte quatre stades au total). En supplément du traitement standard de l'insuffisance cardiaque associant un diurétique de l'anse de Henlé et un inhibiteur de l'ECA, tous les patients ont été traités à la spironolactone. Au bout de deux ans de traitement, l'ajout de spironolactone au traitement standard avait diminué de 31% la mortalité causée par des

problèmes cardiaques. Cet effet a été montré comme étant indépendant de l'homéostasie sodique, mais lié au renouvellement de la matrice extracellulaire¹⁰³. En effet, les patients traités à la spironolactone présentent une diminution des marqueurs de la synthèse des collagènes I et III. Le bénéfice apporté par cet antagoniste pourrait donc être associé à la réduction observée de la fibrose cardiaque¹⁰³. La spironolactone a également montré des effets bénéfiques sur l'insuffisance cardiaque modérée de stade I et II, où le volume d'éjection ventriculaire est augmenté et la masse du ventricule gauche diminuée chez ces patients comparés aux patients recevant le placebo¹⁰⁴.

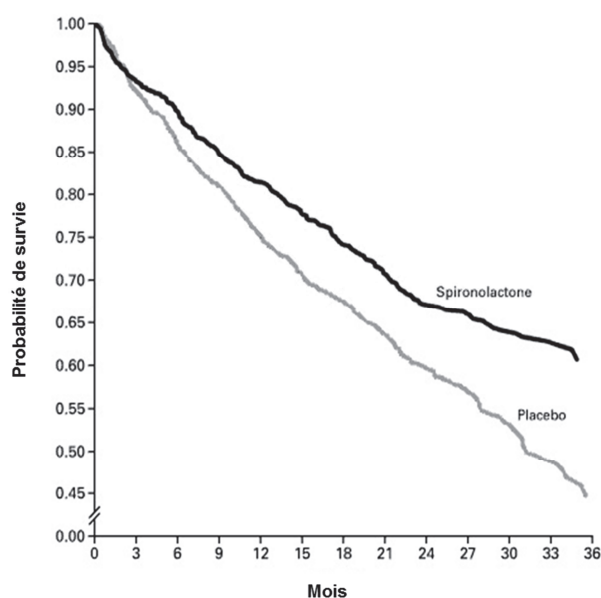


Figure 6. Etude RALES : Probabilité de survie chez les patients insuffisants cardiaques sévères. Le blocage du RM par la spironolactone réduit de 31% le risque de mortalité chez des patients insuffisants cardiaques sévères de stade III et IV selon la classification de l'association New-Yorkaise du cœur (d'après Pitt *et al.*, N Engl J Med, 1999).

1.3.3.3 Etude EPHESUS

En 2003, l'étude EPHESUS (pour *Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study*) a montré des effets bénéfiques de l'éplérénone sur la mortalité de patients victimes d'un infarctus du myocarde et présentant une dysfonction ventriculaire gauche, avec ou sans insuffisance cardiaque¹⁰⁵. Pendant les 16 mois de suivi, le

taux de mortalité globale des patients traités à l'éplérénone a été diminué de 15% et le risque de décès d'origine cardiovasculaire de 17%.

1.3.3.4 Autres études

L'étude EMPHASIS-HF (pour *Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure*) a confirmé les effets bénéfiques de l'inhibition du RM sur le taux de mortalité de patients insuffisants cardiaques, initialement rapportés par l'étude RALES, en utilisant l'éplérénone¹⁰⁶. Les patients inclus présentaient une insuffisance cardiaque de stade II. Près de 26% des patients recevant le placebo sont décédés des suites de pathologies cardiovasculaires, contre seulement 18,3% pour ceux traités avec l'éplérénone. Une étude clinique sur les effets de la spironolactone, réalisée dans six pays différents, a été réalisée récemment chez des patients présentant une insuffisance cardiaque (principalement de stade II et III) avec une fraction d'éjection conservée¹⁰⁷. Cette étude, appelée TOPCAT (pour *Treatment Of Preserved Cardiac function heart failure with an Aldosterone antagonist*) n'a montré aucun effet bénéfique de l'utilisation de la spironolactone. Cependant les résultats de cette dernière étude restent controversés du fait des populations étudiées. En effet, les critères de sélection des patients n'étaient pas homogènes entre les différents centres d'études et ne reflétaient pas la mortalité globale des patients insuffisants cardiaques à fraction d'éjection conservée^{108, 109}. Une étude à postériori sur la population TOPCAT semble montrer que la spironolactone est efficace pour diminuer le taux de mortalité et le nombre d'hospitalisation des patients américains malades, alors qu'elle n'a aucun effet sur ces paramètres chez les patients européens¹¹⁰.

1.3.4 Effets de l'antagonisme du RM sur l'infarctus du myocarde

En plus de ses effets bénéfiques observés chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque à des stades modérés ou sévères, l'éplérénone s'est révélée être bénéfique dans l'évolution de l'infarctus du myocarde. Faisant suite à EPHESUS, l'étude REMINDER (pour *early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure*) a montré que l'éplérénone, dès les 24 heures suivant un infarctus du myocarde, améliore de 10% la mortalité de ces patients par rapport aux patients recevant un placebo¹¹¹.

Cet effet est principalement expliqué par la diminution de la concentration plasmatique du facteur natriurétique de type B (BNP, pour *brain natriuretic peptide*) chez les patients traités à l'éplérénone comparée aux patients recevant le placebo, qui est un marqueur de mauvais pronostic chez les patients victimes d'un infarctus du myocarde¹¹².

1.3.5 Effets de l'antagonisme du RM dans les troubles du rythme cardiaque

Le blocage du RM en clinique présente également des avantages dans le traitement des troubles du rythme cardiaque ou arythmies. Les patients des études cliniques EPHESUS, EMPHASIS-HF ou REMINDER traités avec l'éplérénone ne présentent pas de différence significative dans le nombre d'apparition d'arythmies cardiaques par rapport aux patients traités avec un placebo. Cependant, une étude clinique a montré en 2010 que le blocage du RM diminue le nombre d'arythmies, ce qui pourrait expliquer en partie la diminution importante du taux de mortalité global chez les patients traités avec un antagoniste du RM dans les études citées ci-dessus¹¹³. En effet, la spironolactone est capable de diminuer l'apparition de fibrillation atriale chez les patients comparativement à ceux traités avec un placebo¹¹³. D'autres travaux se sont intéressés à cette problématique et seront développés dans le chapitre 1.5.2.5.

1.3.6 Emergence d'antagonistes non-stéroïdiens

Les études cliniques précédemment citées ne concernent que les effets du blocage du RM chez des patients atteints de pathologies cardiaques. Les antagonistes du RM de première et deuxième génération, bien que globalement bénéfiques, vont empêcher la réabsorption de sodium et augmenter la kaliémie qui peuvent être délétères chez les patients atteints de dysfonctions rénales sévères. Ainsi, de nouveaux antagonistes non-stéroïdiens, dits de troisième génération, sont actuellement en phase d'essai clinique. Ceux-ci sont conçus de façon à ne pas présenter les effets secondaires de type endocrinien des antagonistes stéroïdiens tout en ayant une sélectivité et une efficacité comparables voire plus élevées. L'étude clinique ARTS (pour *mineralocorticoid Receptor antagonist Tolerability Study*) a été la première à évaluer les effets d'un de ces antagonistes de troisième génération, la molécule BAY 94-8862, dérivée des dihydropyridines (bloqueurs des canaux calciques). Les patients

présentant une insuffisance cardiaque de stade II ou III et une dysfonction rénale modérée ont été traités pendant 4 semaines avec un placebo, la spironolactone ou le BAY 94-8862¹¹⁴. Les patients traités avec le BAY 94-8862 présentent une augmentation de la kaliémie et une diminution de la filtration glomérulaire plus faibles que les patients traités avec la spironolactone¹¹⁴. De plus, il semblerait que le BAY 94-8862 ait une distribution équivalente dans le cœur et dans le rein, alors que la spironolactone est plus abondante dans le rein^{87, 88}. Cette molécule semble donc capable de bloquer le RM, tout en limitant l'hyperkaliémie. Cependant, cette étude demande à être complétée car les effets cardiaques de cette molécule n'ont pas été étudiés, et sa comparaison avec un antagoniste de seconde génération apparaît nécessaire.

1.4 Mécanismes d'action du RM

Deux types de mécanismes d'action ont été décrits pour le RM, à savoir des mécanismes génomiques et des mécanismes non génomiques.

1.4.1 Effets non génomiques du RM

Ceux-ci sont caractérisés par des temps d'action très courts, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes. Ces effets rapides de l'aldostérone peuvent s'exercer *via* le RM ou *via* d'autres voies (le blocage du RM n'inhibant pas l'effet de l'aldostérone)¹¹⁵. Ces effets rapides de l'aldostérone peuvent agir par exemple sur le pH et le calcium intracellulaire au niveau des différents tissus cibles de l'hormone^{116, 117}. Plusieurs travaux suggèrent fortement qu'un récepteur membranaire distinct du RM et activé par le RM pourrait rendre compte des effets de l'aldostérone. *In vitro*, la stimulation d'ERK1/2 par l'aldostérone dans une culture primaire de cellules musculaires lisses vasculaires de rat peut être bloquée aussi bien par un antagoniste du RM que par un antagoniste du récepteur membranaire couplé aux protéines G de type 30 (GPR30, pour *G protein-coupled receptor 30*)¹¹⁸. Une autre étude a montré que l'aldostérone est capable d'induire l'influx de sodium dans la lignée cellulaire rénale de rat RCCD2 sans être internalisée dans la cellule (l'aldostérone est liée de manière covalente à l'albumine empêchant l'entrée de l'hormone dans la cellule), témoignant que cet effet n'est pas directement induit par le RM³². De plus, le transport intracellulaire de c-src (de la famille des *src* kinases induisant des voies de signalisation pro-inflammatoires) par des radeaux

lipidiques ou par des vésicules d'endocytose cavéoline-dépendantes est modulé par un récepteur activé par l'aldostérone¹¹⁹. Au contraire, d'autres travaux ont contredit l'hypothèse d'un récepteur membranaire pour expliquer les effets non génomiques du RM. En effet, l'éplérénone est capable de bloquer l'augmentation de calcium intracellulaire, induite par l'aldostérone, en quelques minutes dans des artères mésentériques de rat¹²⁰.

En conclusion, les mécanismes non génomiques du RM restent à ce jour encore mal connus. Mon sujet de thèse a porté sur l'étude des gènes cibles dont la transcription est induite par le RM et nous allons développer dans le chapitre suivant les mécanismes d'action génomiques du RM.

1.4.2 Effets génomiques du RM

Les mécanismes génomiques relèvent de temps d'action de l'ordre de plusieurs heures car ils nécessitent la transcription et la traduction des gènes. L'activité transcriptionnelle du RM est commune aux autres récepteurs nucléaires. Elle peut être décrite en plusieurs étapes faisant intervenir les différents domaines structuraux du RM. La liaison de l'hormone au RM dans le cytoplasme marque le commencement du processus. Cette liaison induit un changement de conformation du récepteur, libérant ses protéines chaperonnes cytoplasmiques¹²¹. Le complexe ligand/RM migre dans le noyau et se fixe dans la région promotrice des gènes cibles du RM à ses éléments de réponse hormonale (ERH). Ces ERH sont des séquences spécifiques qui possèdent des motifs particuliers permettant la liaison du complexe ligand/RM à l'ADN¹²². Une séquence consensus, composée d'un hexanucléotide séparé de trois nucléotides, est retrouvée dans tous les ERH : PuGNACAnnnTGTNCPy (où Pu désigne une base purique à savoir A ou G, et Py désigne une base pyrimidique C ou T)¹²³. Le RM et le RG, bien que partageant les mêmes ERH, modulent des fonctions physiologiques distinctes en régulant l'expression de groupes de gènes identiques et différents. Ce paradoxe apparent s'explique par la capacité des récepteurs à reconnaître des séquences communes mais aussi des séquences spécifiques leur conférant leur spécificité transcriptionnelle. Cette variation de séquence, à partir d'une séquence commune très conservée, permet ainsi d'influencer l'affinité relative du RM pour un ERH particulier¹²⁴. Une fois positionné sur l'ADN sous sa forme dimérisée, le RM joue son rôle de facteur de transcription. Par l'intermédiaire de ses domaines régulant l'activité transcriptionnelle AF-1 et AF-2, il peut recruter des corégulateurs de la transcription^{125, 126}. Ces derniers agissent de façon séquentielle

et combinée, en présentant des effets d'activation ou de répression¹²⁷. Les co-activateurs décompactent la chromatine favorisant ainsi la mise en place du complexe d'initiation de la transcription. Ils peuvent également participer à l'élongation de la phase de transcription et à sa terminaison, et de plus recruter d'autres corégulateurs¹²⁷. A l'heure actuelle, une douzaine de corégulateurs interagissant avec le RM sont répertoriés. Le co-activateur de type 1 des récepteurs stéroïdes (SRC-1, pour *steroid receptor coactivator-1*), de grande affinité pour les récepteurs nucléaires, est présenté comme initiant la transcription des gènes cibles du RM par le recrutement de protéines impliquées dans l'acétylation des histones ou la méthylation des nucléotides induisant le remodelage de la chromatine¹²⁸. Son variant, SRC-1e, interagit spécifiquement avec la région N-terminale du RM¹²⁹. L'histone acétylase CBP/p300 recrute l'ARN polymérase II au niveau du domaine AF-2 du RM¹²⁷ alors que le facteur d'élongation de l'ARN polymérase II (ELL, pour *eleven-nineteen lysine-rich leukemia*) interagit avec AF-1¹³⁰. Ce dernier agit d'ailleurs comme un corépresseur du RG et n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux androgènes et à la progestérone¹³⁰. Les corépresseurs, au contraire, induisent la condensation de la chromatine et ont pour conséquence d'inhiber la transcription. La protéine SUMO-ligase de type 1 *protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-1* PIAS-1, en interagissant avec la région N-terminale du RM, inhibe son activité transcriptionnelle (comme décrit précédemment)¹³¹.

1.5 Rôle physiopathologique du RM dans le cœur et le rein

L'identification des cellules exprimant spécifiquement le RM a été rendue possible par l'utilisation de techniques permettant de détecter son ARNm, son expression protéique ainsi que sa liaison à l'aldostérone. Les cellules cibles classiques de l'aldostérone exprimant le RM sont les cellules épithéliales du tubule contourné distal et du tubule collecteur rénaux. Les cellules de l'épithélium colique distal et des canaux excréteurs des glandes salivaires et sudoripares s'ajoutent à ces cibles classiques^{26, 132, 133}. Cependant le RM s'exprime également dans d'autres tissus non-épithéliaux. Ces cellules non classiques incluent les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les monocytes circulants et les macrophages, mais également les adipocytes, les kératinocytes, les cellules rétiennes et certaines cellules neuronales²⁴.

Nous développerons plus particulièrement dans les chapitres suivants les voies de signalisation du RM dans le rein (historiquement décrite) et le cœur, et plus particulièrement la voie de signalisation du RM dans le cardiomyocyte.

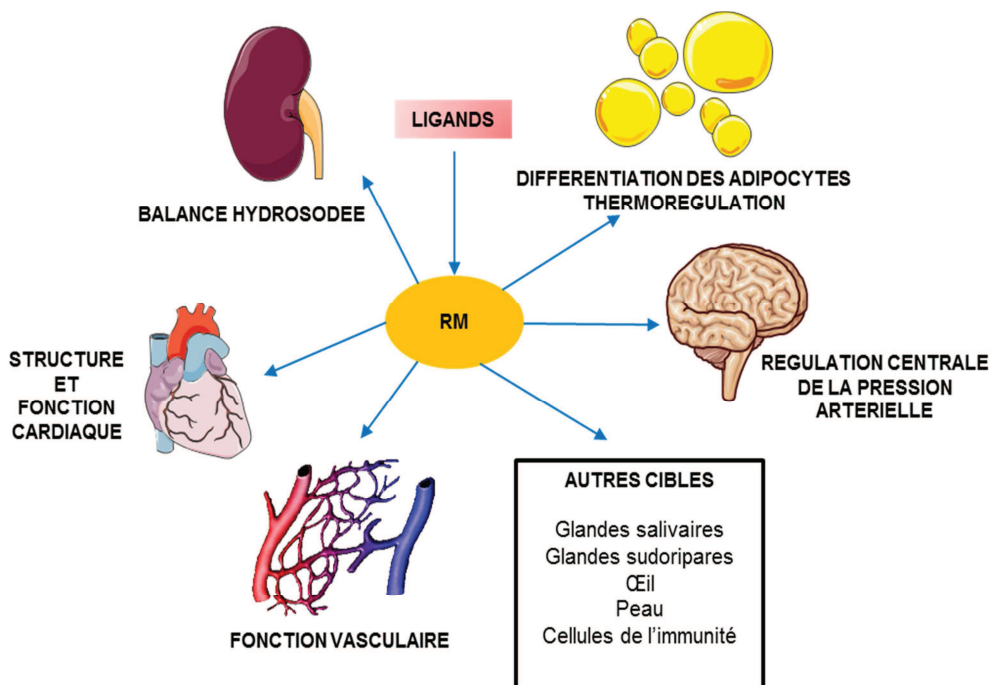


Figure 7. Les différentes cibles du récepteur minéralocorticoïde. L'activation du RM par l'aldostérone ou les glucocorticoïdes induit plusieurs processus biologiques en fonction du tissu concerné. Son activation inappropriée est impliquée dans de nombreuses altérations tissulaires pouvant mener au développement d'hypertension, de résistance à l'insuline ou de pathologies cardiovasculaires.

1.5.1 Effets génomiques classiques du RM dans l'épithélium rénal

La réponse de l'épithélium rénal à l'aldostérone *via* son récepteur minéralocorticoïde est très bien décrite au niveau physiologique et au niveau des mécanismes moléculaires. Cette réponse fait suite à une baisse de la volémie, qui en retour active le SRAA et augmente l'aldostéronémie. L'aldostérone contrôle au niveau de l'épithélium rénal le transport transépithélial de sodium. En effet, dans les cellules épithéliales du néphron distal, la liaison de l'aldostérone au RM entraîne la translocation nucléaire de ce dernier. Le complexe aldostérone/RM permet l'expression précoce de plusieurs protéines déterminantes dans le maintien de l'homéostasie sodique. Parmi celles-ci, nous pouvons citer :

- les trois sous-unités (α , β et γ) du canal épithélial sodique ENaC. Ces trois sous-unités s'assemblent pour former le canal ENaC. Adressé à la membrane apicale, ce canal permet le transport du sodium présent dans l'urine primitive du pôle apical de la cellule épithéliale vers son pôle basal¹³⁴.

- la pompe ionique ATPasique sodium/potassium (Na^+ , K^+ -ATPase). Elle est exprimée à la membrane basale de la cellule épithéliale et transporte le sodium cytoplasmique vers le milieu extracellulaire¹³⁵. Ce processus s'effectue contre le gradient de concentration ionique qui nécessite de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate ou ATP. Ainsi, la pompe permet la sortie de trois ions sodium, et l'entrée de deux ions potassium.

- la sérine/thréonine kinase régulée par les glucocorticoïdes de type 1 (Sgk-1 pour *Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1*). Son activité kinase permet, par phosphorylation inhibitrice, de prévenir l'internalisation et la dégradation du canal ENaC, ce qui a pour conséquence de maintenir son activité^{136, 137}.

L'expression de Sgk-1 est rapidement induite par le RM dans l'épithélium rénal et phosphoryle la protéine cytoplasmique de la famille des ubiquitines ligases Nedd4-2 (pour *Neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4-member 2*). La forme phosphorylée de Nedd4-2 est inactive et prévient l'adressage d'ENaC vers le protéasome (via l'ubiquitination)¹³⁸. Par conséquent, Sgk-1 en empêchant l'internalisation d'ENaC, maintient l'activité de ce canal¹³⁸⁻¹⁴⁰. De plus, l'activité de Sgk-1 est également régulée. En effet, Sgk-1 possède un motif de localisation vers le réticulum endoplasmique où elle est ubiquitinée et dégradée. L'expression de la protéine à domaine leucine zipper induite par les glucocorticoïdes de type 1 (GILZ-1, pour *glucocorticoid-induced leucine zipper protein-1*) est aussi précocement induite par le complexe aldostérone/RM. En inhibant ERK1/2, dans des cellules épithéliales rénales de souris, GILZ-1 bloque indirectement le transport d'ENaC vers le protéasome¹⁴¹⁻¹⁴³. GILZ-1 peut aussi bloquer la dégradation de Sgk-1 et ainsi favoriser le maintien de l'activité d'ENaC et de la réabsorption de sodium¹⁴⁴. La régulation d'ENaC via le complexe aldostérone/RM a également été mise en évidence dans les épithéliums colique, digestif ou pulmonaire¹⁴⁵. Des travaux récents ont observé l'expression d'ENaC dans les cellules endothéliales, suggérant que le complexe aldostérone/RM peut aussi réguler ce canal dans l'endothélium¹⁴⁶. Cependant, cette modulation semble distincte de celle observée dans l'épithélium rénal dans la mesure où le rôle de Nedd4-2 ou GILZ-1 n'a pas été clairement établi¹⁴⁷.

Ces protéines induites précocement par le complexe aldostérone/RM permettent la réabsorption de sodium des urines vers le milieu extracellulaire comme le sang. En réponse à

cette pression osmotique différente, l'eau suit le mouvement des ions pour maintenir l'équilibre hydrosodé, résultant en une augmentation du volume sanguin et par conséquent une augmentation de la pression sanguine, donc de la pression artérielle.

En conclusion, il est désormais reconnu que i) l'expression du RM ne se limite pas aux épithéliums et que ii) sa fonction ne se limite pas au contrôle de l'homéostasie sodique. Après la mise en évidence de son expression dans le cœur et les vaisseaux, les études de ces deux dernières décennies montrent l'implication du RM dans la progression de pathologies cardiaques et vasculaires. Ces nouvelles fonctions du RM, bien que toujours sujettes à débat, semblent indépendantes de son action sur la rétention sodée et des conséquences de celle-ci sur le système cardiovasculaire (augmentation de la volémie, augmentation des résistances périphériques et augmentation de la post-charge cardiaque). Le chapitre suivant se focalise sur le rôle du RM dans l'un des tissus composant ce système; le tissu cardiaque. Nous analyserons son mécanisme d'action et son implication dans trois processus pathologiques à savoir le remodelage de la matrice, le remodelage électrophysiologique ou encore l'inflammation.

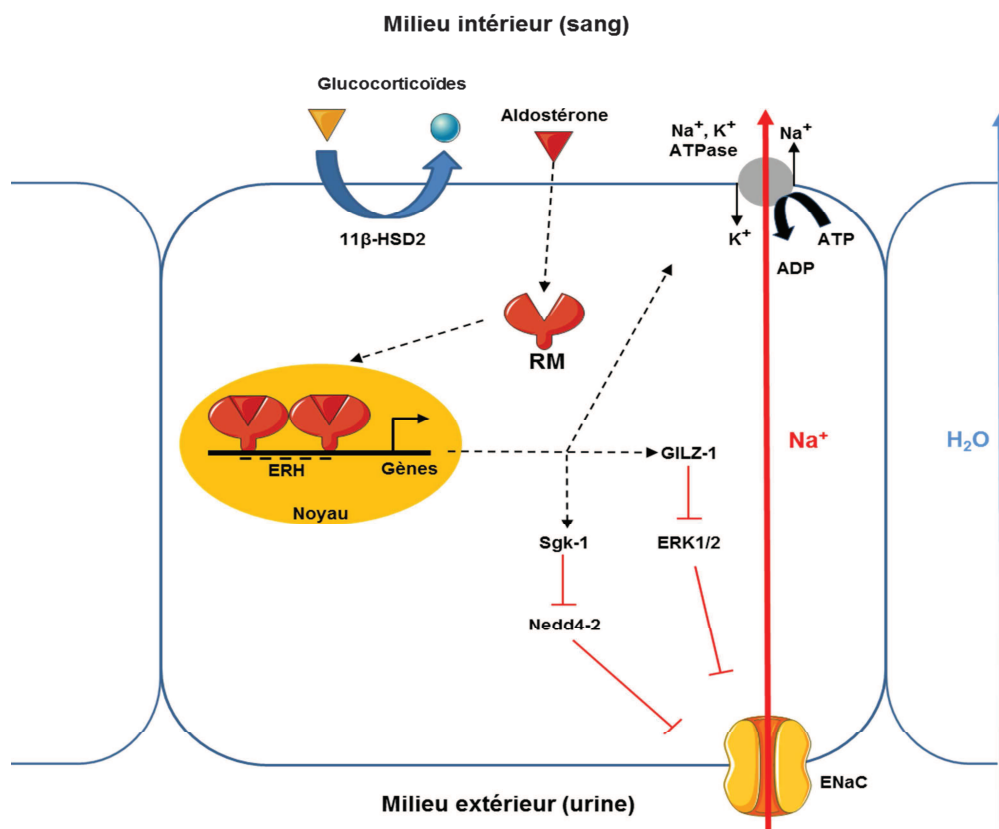


Figure 8. Effets du RM sur l'épithélium du néphron distal. Au niveau du néphron distal, la liaison de l'aldostérone au RM va entraîner la transcription des gènes codant pour ENaC et pour la pompe Na⁺, K⁺-ATPase, qui vont permettre la réabsorption de sodium à travers l'épithélium rénal. Sgk-1 inhibe la dégradation d'ENaC en inhibant l'action de Nedd4-2, ce

qui maintient son activité et participe au transport sodique. De plus, GILZ-1 inhibe ERK1/2 empêchant le transport d'ENaC vers le protéasome. La présence de l'enzyme 11 β -HSD2 empêche les glucocorticoïdes de se fixer au RM. Les flèches noires sont activatrices et les flèches rouges inhibitrices. ADP : adénosine diphosphate; ATP : adénosine triphosphate; ENaC : *epithelial sodium channel*; ERH : éléments de réponse hormonale; ERK1/2 : *extracellular-regulated kinase1/2* ; GILZ-1 : *glucocorticoid-induced leucine zipper protein-1*; Nedd4-2 : *Neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4-member 2*; Sgk-1 : *Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1*.

1.5.2 Effets génomiques du RM cardiaque

Dans l'organisme, le cœur est la pompe permettant la circulation du sang dans tous les tissus pour maintenir leur bon fonctionnement. C'est un organe creux musculaire constitué de deux oreillettes et de deux ventricules, séparé en deux circuits distincts droit et gauche. La partie droite reçoit le sang provenant des tissus, pauvre en oxygène. Une fois ré-oxygéné par les poumons, le sang est ensuite éjecté par la partie gauche du cœur vers les tissus périphériques où ils puisent l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur fonctionnement. Différents types cellulaires sont présents dans le cœur. Les cellules majoritaires sont les fibroblastes (environ 70%) et les cardiomyocytes (environ 30%), ces derniers représentant près de 80% de la masse totale du cœur. Par conséquent, l'observation de la régulation génique au niveau du cœur reflète principalement celle de gènes exprimés par les cardiomyocytes. D'autres cellules présentes en plus faibles proportions sont les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Toutes ces cellules expriment le RM à l'état basal^{65, 148}. Dans le cœur pathologique, l'inflammation, le stress oxydatif et le remodelage cardiaque induisent la présence de cellules de l'immunité comme les lymphocytes T CD4⁺ (cluster de différenciation de type 4 positif) et les macrophages de type M1 et M2^{149, 150}. Le RM est également exprimé dans ces cellules, principalement dans les cellules présentatrices d'antigène comme les macrophages et les cellules dendritiques, suggérant pour le RM des implications pathologiques multiples selon les tissus et les cellules concernés. En revanche, l'enzyme 11 β -HSD2 est peu exprimée dans le cardiomyocyte et de ce fait ne semble pas pouvoir produire une activité suffisante pour maintenir la sélectivité de l'aldostérone pour le RM, suggérant un effet glucocorticoïde sur le RM du cardiomyocyte^{65, 151}.

De nombreuses études sur l'animal ont montré des effets délétères sur le cœur, après l'administration combinée d'aldostérone et de sel. Inversement, le blocage du RM prévient les effets délétères de l'aldostérone et du sel, particulièrement au niveau du cœur, impliquant le RM au centre de la physiopathologie cardiaque. Plus important, ces résultats suggèrent

fortement que l'aldostérone, malgré la présence majoritaire des glucocorticoïdes, se fixe à son récepteur et induit des voies de signalisation cardiaque spécifiques.

1.5.2.1 Blocage pharmacologique du RM *in vivo*

Depuis le début des années 1990, de nombreux modèles expérimentaux de surcharge minéralocorticoïde ont été mis en place pour mimer une activation inappropriée du SRAA. Les plus couramment utilisés sont, le modèle de perfusion d'aldostérone adjoint d'un régime riche en sel et d'une néphrectomie unilatérale (le modèle Néphrectomie-Aldostérone-Sel ou NAS) et ses variantes, le modèle Aldostérone-Sel ou encore le modèle acétate de désoxycorticostérone-Sel (DOCA-Sel, pour *deoxycorticosterone acetate*), la DOCA étant une hormone précurseur de l'aldostérone. La co-administration d'aldostérone et de sel, associée à une néphrectomie unilatérale, induisent chez le rat une augmentation de la pression artérielle systémique. A cette hypertension s'ajoute de manière indépendante une accumulation de collagène I et III dans la matrice extracellulaire des deux ventricules cardiaques (fibrose interstitielle) ainsi qu'autour des vaisseaux du cœur (fibrose périvasculaire)^{4, 152, 153}. Ces travaux sont les premiers à avoir identifié le rôle profibrosant de ce modèle dans le ventricule droit, suggérant un effet partiellement indépendant de la pression artérielle (qui n'est pas augmentée dans le ventricule droit). Plus récemment, une étude sur des rats spontanément hypertendus et sensibles aux accidents vasculaires (SHRSP, pour *stroke-prone spontaneously hypertensive*) a mis en évidence de la fibrose dans les deux ventricules par une forte dose de sel, qui est prévenue par l'éplérénone¹⁵⁴.

En conclusion, ces différents modèles expérimentaux induisent tous une hypertension, une hypertrophie cardiaque ainsi que le développement de fibrose à la fois dans le ventricule gauche et dans le ventricule droit¹⁵⁵. L'utilisation de la spironolactone, en bloquant l'augmentation des taux de collagène I et III dans le cœur^{156, 157}, démontre l'implication du complexe aldostérone/RM dans ces phénomènes de remodelage cardiaque et son rôle dans la physiopathologie cardiaque. L'organisation temporelle de ce remodelage cardiaque ainsi que tous les facteurs associés restent encore méconnus. Cependant, tous les modèles de surcharge minéralocorticoïde sont capables d'induire des phénomènes d'hypertrophie, de fibrose, de stress oxydatif et d'inflammation, tous diminués ou totalement prévenus par l'utilisation d'antagonistes du RM. Dans le modèle NAS chez le rat, l'expression du facteur profibrosant, *transforming growth factor- β* (TGF- β), est augmentée et permet d'induire le remodelage cardiaque¹⁵⁸. L'inhibition d'un des récepteurs de l'angiotensine II diminue son expression. Le

TGF- β peut stimuler l'expression de la protéine profibrosante PAI-1, du collagène de type I, et diminuer l'expression de certaines métalloprotéases matricielles (MMPs, pour *matrix-metalloproteinases*)¹⁵⁹. Cette induction par le modèle NAS de fibrose cardiaque est précédée chez le rat par l'augmentation de molécules pro-inflammatoires comme la cyclo-oxygénase-2 et la chimiokine *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1)¹⁶⁰. L'ajout d'éplérénone, en atténuant l'augmentation de ces molécules, freine la gravité des lésions dans le tissu cardiaque¹⁶⁰. De plus, ce modèle NAS chez le rat augmente l'expression de la sous-unité gp91^{phox} de la NADPH oxydase¹⁶¹. La NADPH oxydase est une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène, participant à la mise en place de stress oxydatif. En prévenant partiellement l'expression de gp91^{phox}, la spironolactone diminue le stress oxydatif¹⁶¹.

1.5.2.2 Implication du RM dans les pathologies cardiaques

Le blocage du RM a également permis de faire avancer les connaissances sur son implication en physiopathologie dans différents modèles expérimentaux de pathologies cardiaques, présentés ci-après. Un traitement à l'éplérénone chez des rats de la lignée Dahl (modèle d'induction d'hypertension après un régime riche en sel ne présentant pas d'augmentation de l'aldostéronémie) prévient l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques, ainsi que l'inflammation des coronaires¹⁶². D'autres modèles pathologiques ont rapporté un effet bénéfique de l'éplérénone dans l'évolution des pathologies cardiaques. La fraction d'éjection cardiaque est améliorée chez des souris traitées à l'éplérénone dans un modèle d'infarctus du myocarde¹⁶³. Un modèle d'insuffisance cardiaque chez la souris présente également un ralentissement du développement de la dysfonction ventriculaire gauche après traitement à l'éplérénone¹⁶⁴. De la même manière l'hypertrophie et la fibrose ventriculaires, induites par la dysfonction diastolique développée chez les rats de la lignée Dahl, sont prévenues par l'antagoniste¹⁶⁵.

Des travaux se sont également intéressés à l'activation du RM chez des rats SHRSP. La dénervation sinoaortique, augmentant la variabilité de la pression sans modifier la pression moyenne, entraîne la translocation nucléaire du RM dans les cellules vasculaires intracardiaques et les cardiomyocytes. Cette activation du RM participe *in vivo* aux effets délétères de la variation de pression à savoir, la fibrose, le recrutement de cellules inflammatoires, l'hypertrophie et la diminution de la fraction d'éjection cardiaque, tous ces processus étant prévenus par l'éplérénone¹⁶⁶.

1.5.2.3 Etude de la signalisation cardiaque du RM *in vitro*

Toutes ces études ci-dessus résumées concernent la signalisation du RM cardiaque *in vivo*. Cette approche intégrée rend difficile la compréhension des mécanismes moléculaires spécifiques mis en jeu lors de la fixation du ligand au RM du cardiomyocyte. C'est pourquoi de nombreux travaux se sont intéressés à l'exploration de la signalisation induite par le complexe aldostérone/RM avec l'approche cellulaire. L'aldostérone dans des cultures primaires de cardiomyocytes de rats adultes induit une augmentation du niveau d'expression des MMP-2 et MMP-9 dépendant des espèces réactives de l'oxygène. En effet, l'inhibition de la NADPH oxydase prévient totalement l'effet de l'aldostérone sur les MMP-2 et MMP-9 cardiomyocytaires¹⁶⁷. Cependant, cette étude a été réalisée avec des doses d'aldostérone plus de 100 fois supérieures aux doses physiologiques, remettant en question la pertinence des résultats. Néanmoins une étude du remodelage cardiaque lors du vieillissement physiologique réalisée sur des rats jeunes (2 mois) ou adultes (8 ou 30 mois) non traités, semble confirmer *in vivo* les études *in vitro*¹⁶⁷. Une corrélation est observée entre l'âge et l'augmentation de la NADPH oxydase, de la MMP-2 et de l'aldostéronémie¹⁶⁸. L'étude du transcriptome total de cardiomyocytes a également permis d'identifier des gènes directement et spécifiquement régulés par l'aldostérone⁶⁸. L'ensemble des ARNs de cellules H9C2-RM⁺ traitées avec de l'aldostérone à 1 nM a été comparé à celui de cellules non traitées. Plusieurs gènes ont été identifiés comme spécifiquement régulés par l'aldostérone parmi lesquels des gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire comme *Tenascin-X*, *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1* (Adamts1) et PAI-1. Sont aussi modulés positivement des gènes impliqués dans la régulation du tonus vasculaire comme le *Regulator of G-protein signalling-2* (Rgs-2) ou encore des gènes impliqués dans les phénomènes inflammatoires comme *Orosomucoid-1*. Cette étude clé nous a permis d'aborder "l'approche pharmacologique" développée dans les résultats de ma thèse.

1.5.2.4 L'apport des modèles transgéniques dans la compréhension de la signalisation du RM

Pour valider et approfondir les connaissances apportées *in vitro* et compléter celles provenant des modèles de pathologies cardiaques, plusieurs études sur la signalisation du RM cardiaque ont utilisé les modèles animaux transgéniques. Il est à noter que l'inactivation globale et constitutive du RM est létale dès les premiers jours suivants la naissance, du fait de la fuite sodée rénale sévère. Ce modèle confirme le rôle crucial du RM dans la régulation de

la réabsorption rénale de sodium. Différents modèles surexprimant ou inactivant le RM spécifiquement dans un type cellulaire donné ont permis de dissocier les effets tissus-spécifiques du RM. Ils ont aidé à mieux comprendre le rôle spécifique du RM dans chaque type cellulaire où il s'exprime et ainsi de mieux appréhender son rôle global dans le tissu étudié. J'ai choisi de ne présenter ici que les modèles de surexpression et d'inactivation, dans le cardiomyocyte, du RM ou de l'aldostérone synthase, étant ceux permettant de documenter au mieux mon sujet de thèse. Les surexpressions de l'aldostérone synthase¹⁶⁹ et du RM¹⁷⁰ ne permettent pas à elles seules d'induire la fibrose cardiaque. Ces observations vont dans le même sens que celles effectuées lors de la perfusion unique d'aldostérone (ou de DOCA). Ces hormones seules n'expliquent pas le développement de fibrose cardiaque chez le rat et la souris. Ceci suggère l'intervention d'un ou de plusieurs cofacteurs, comme dans les modèles de surcharge minéralocorticoïde. Il est évident aujourd'hui que l'ajout de sel est nécessaire, même si les mécanismes régissant son action ne sont pas encore élucidés. Des souris hypertendues surexprimant l'aldostérone synthase dans le cardiomyocyte et la rénine dans le foie présentent une hypertrophie cardiaque^{171, 172}. Cette propriété semble impliquer le facteur atrial natriurétique (ANP, pour *atrial natriuretic peptide*), molécule anti-hypertrophique. En effet, celui-ci n'est pas surexprimé chez ces souris (son expression est semblable aux souris contrôles) et l'ajout d'éplérénone prévient totalement la diminution d'expression de ce peptide, montrant que l'aldostérone inhibe l'expression d'ANP *via* le RM¹⁷². La même équipe a montré que ces mêmes souris transgéniques présentaient une augmentation de molécules pro-inflammatoires et profibrosantes comme TGF- β , ainsi qu'une diminution de l'expression de facteurs antifibrosants. L'éplérénone empêche cette diminution d'expression suggérant l'implication du RM dans la modulation des facteurs de régulation de la fibrose cardiaque¹⁷¹. Le modèle surexprimant l'aldostérone synthase dans le cardiomyocyte montre quant à lui une dysfonction vasculaire au niveau des artères coronaires¹⁷³. L'augmentation de la synthèse de l'aldostérone dans le cardiomyocyte altère les réponses de relaxation indépendante du monoxyde d'azote des artères coronaires en inhibant l'expression de canaux potassiques dépendants du calcium au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires¹⁷³. Par contre, cette augmentation d'aldostérone empêche la réduction de la densité capillaire observée lors d'un diabète de type 1 expérimental¹⁷⁴. L'importance de la voie minéralocorticoïde dans la circulation coronaire a également été observée et complétée récemment. Des souris surexprimant le RMh spécifiquement dans les cardiomyocytes présentent une sévère dysfonction de la réponse de relaxation dépendante du monoxyde d'azote dans les artères coronaires. Cet effet délétère est prévenu par le blocage du RM mais aussi par le blocage de la

NADPH oxydase¹⁷⁵. L'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase est en effet observée chez ces souris transgéniques dans les cellules endothéliales coronariennes, suggérant un effet paracrine du cardiomyocyte sur la réactivité vasculaire des coronaires, *via* la NADPH oxydase.

L'inactivation tissu-spécifique du RM a permis également de mieux définir les effets de celui-ci dans la physiopathologie cardiaque. Les souris dépourvues de RM dans les cardiomyocytes présentent une hypertrophie cardiaque et une expression plus forte que chez les contrôles de l'ANP à l'état de base. La sténose de la crosse aortique, modèle d'insuffisance cardiaque, induit un remodelage cardiaque et une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche, menant à une dilatation du ventricule et aboutissant à une insuffisance cardiaque. La délétion du RM dans les cardiomyocytes protège des effets délétères de la sténose sur la fonction cardiaque, contrairement à la délétion du récepteur dans le fibroblaste cardiaque¹⁷⁶. Cette inactivation du RM dans le cardiomyocyte protège également des effets de l'infarctus du myocarde sur la fonction et le remodelage cardiaques. Une étude a montré qu'après la ligature de la coronaire gauche, entraînant un infarctus du myocarde, les souris inactivées pour le RM spécifiquement dans le cardiomyocyte présentent une meilleure fraction d'éjection du ventricule gauche et une zone d'infarctus plus réduite que leurs souris contrôles. La néo-vascularisation plus importante est due à l'expression augmentée du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire de type a (VEGF-a, pour *vascular endothelial growth factor-a*) par rapport aux souris contrôles¹⁷⁷. Le remodelage et l'inflammation cardiaques induits par le modèle DOCA-Sel sont également prévenus dans ce modèle transgénique. Une étude a montré chez ces souris soumises au modèle DOCA-Sel une prévention de l'augmentation d'expression de marqueurs pro-fibrosants comme TGF- β ainsi qu'une diminution du nombre de macrophages infiltrés dans le tissu par rapport à leurs contrôles¹⁷⁸. Cette même équipe a étudié l'effet du modèle DOCA-Sel sur des souris étant inactivées spécifiquement pour le RM dans les monocytes et les macrophages. Ces souris n'ont pas d'altération du recrutement des monocytes et des macrophages vers ces zones inflammatoires induites par le modèle. Par contre, la fibrose cardiaque et l'augmentation de la pression artérielle sont prévenues. Cette étude suggère un nouveau rôle de la signalisation minéralocorticoïde des macrophages dans le cœur sous ces conditions physiopathologiques particulières¹⁷⁹.

1.5.2.5 Rôle du RM dans les arythmies cardiaques

1.5.2.5.1 Effets du RM sur les arythmies cardiaques en clinique

Les troubles du rythme cardiaque, ou arythmies, ont pour conséquences des contractions irrégulières, anarchiques et rapides du cœur. À terme, ces troubles peuvent conduire à une insuffisance cardiaque voire même à l'arrêt. Les arythmies peuvent avoir pour origine les oreillettes comme la fibrillation atriale, ou les ventricules comme la fibrillation ventriculaire et les tachycardies ventriculaires et supraventriculaires. Bien que son rôle soit souvent sous-estimé, il est aujourd'hui reconnu que le complexe aldostérone/RM dans le cœur participe à la mise en place de ces arythmies. Une étude clinique en 2006 a mis en évidence une association entre une concentration plasmatique en aldostérone élevée et le développement de fibrillation et de tachycardie ventriculaires chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde¹⁸⁰. De manière complémentaire, l'administration d'antagonistes pharmacologiques du RM chez ces patients réduit considérablement le développement de tachycardie et de fibrillation ventriculaires¹⁸¹. Le rôle bénéfique des antagonistes du RM et les effets délétères de l'aldostérone ont également été observés dans la fibrillation atriale. Les patients atteints d'hyperaldostéronisme sont plus sujets à la fibrillation atriale que des patients atteints d'hypertension sans hyperaldostéronisme¹⁸². Par contre, lors d'une restauration électrique du rythme cardiaque, les patients atteints de fibrillation atriale voient leur aldostéronémie élevée diminuer rapidement¹⁸³. De plus, l'expression du RM et de la 11 β -HSD2 dans les oreillettes est augmentée chez ces patients atteints de fibrillation atriale^{184, 185}. Le blocage pharmacologique du RM par la spironolactone entraîne chez ces patients une diminution du nombre d'hospitalisations et d'interventions restaurant le rythme cardiaque¹⁸⁶.

1.5.2.5.2 Effets du RM sur les arythmies cardiaques chez l'animal

De nombreux travaux expérimentaux se sont intéressés à l'activation du RM et à son implication dans la conduction électrique cardiaque pouvant mener aux arythmies. En effet, l'activation du RM a des conséquences sur le maintien de l'homéostasie calcique cellulaire. L'aldostérone augmente l'activité du canal calcique de type T dans la lignée cellulaire HL-1 de cellules atriales de souris et diminue parallèlement les courants potassiques correcteurs (IKr, pour *rapidly-activating delayed rectifier potassium currents*)¹⁸⁴. Ces effets de l'aldostérone passent au moins par le RM puisque la spironolactone les prévient en partie. L'expression et l'activité de ce canal sont également augmentées dans des cultures primaires

de cardiomyocytes de rats nouveau-nés¹⁸⁷. *Ex vivo*, sur des cardiomyocytes de souris¹⁸⁸ ou de rats nouveau-nés¹⁸⁹, une excellente corrélation positive a été trouvée entre la concentration en aldostérone et l'activité du canal calcique de type L. *In vivo*, les souris surexprimant le RMh spécifiquement dans les cardiomyocytes présentent un remodelage ionique important¹⁷⁰. Le courant potassique Ito diminue alors que celui provenant du canal calcique de type L augmente. Le récepteur à la ryanodine, qui permet la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme, est lui aussi modifié par l'activation du complexe aldostérone/RM. Les souris surexprimant le RMh spécifiquement dans les cardiomyocytes ou l'infusion d'aldostérone n'altèrent pas l'expression du récepteur à la ryanodine *in vivo*¹⁹⁰. Par contre, ces modèles entraînent une diminution d'expression du complexe d'inhibition du récepteur, responsable de l'ouverture anormale de celui-ci. Cette ouverture permet la fuite de calcium dans le cytoplasme qui joue un rôle important dans la mise en place d'arythmies cardiaques¹⁹⁰. L'observation d'une létalité post-natale de plus de 50% chez ces souris transgéniques (sans altération de la structure cardiaque) suggère une mortalité relative à une dysfonction cardiaque, comme l'arythmie¹⁷⁰. Bien que ces travaux indiquent un effet délétère de l'aldostérone sur les troubles du rythme cardiaque, ils ne permettent cependant pas de discriminer le rôle propre de l'hormone.

Expérimentalement, les antagonistes pharmacologiques du RM sont capables de prévenir partiellement les troubles du rythme cardiaque. Chez des hamsters TO-2 présentant spontanément des tachycardies ventriculaires, le nombre de ces dernières est diminué avec l'éplérénone et la conduction électrique est améliorée¹⁹¹. Cet effet est dû en partie à l'amélioration de la dépression du segment ST et de la diminution de l'intervalle QT, variables composant l'électrocardiogramme¹⁹¹. Après une sténose de la crosse aortique, les souris montrent une diminution de l'expression de la connexine 43 dans les jonctions de type Gap accompagnée d'altérations de la vitesse de conduction. Ce remodelage est prévenu par la spironolactone, et comme l'éplérénone, permet l'amélioration de la vitesse de conduction¹⁹². Dans un modèle de fibrillation atriale chez le chien, la spironolactone empêche le développement de l'arythmie. De plus, elle prévient le remodelage des oreillettes ainsi que la fibrose et la mort par apoptose des cardiomyocytes¹⁹³. Plus en amont du SRAA, un inhibiteur de l'ECA diminue le développement de fibrillation atriale provoquée électriquement chez le chien¹⁹⁴. Cependant, l'inhibition de l'ECA semble moins efficace que celle du RM. Une étude clinique a en effet montré que la spironolactone, avec ou sans ajout d'un inhibiteur de l'ECA, diminue de 3 à 6 fois l'apparition d'évènement de fibrillation atriale comparativement aux patients n'ayant pas reçus la spironolactone¹¹³.

En conclusion, ces études chez l'homme et l'animal soulignent le rôle du complexe aldostérone/RM dans le développement de troubles du rythme cardiaque. Le complexe aldostérone/RM altère la structure des oreillettes et des ventricules ainsi que leurs propriétés électrophysiologiques, et les arythmies atriales et ventriculaires en résultant sont bloquées en partie par l'utilisation d'antagonistes du RM.

1.6 Objectifs de la thèse

Pour mieux appréhender la physiopathologie du RM, notre laboratoire étudie les effets du complexe aldostérone/RM dans les tissus non épithéliaux à l'aide de modèles cellulaires et de modèles animaux transgéniques. Mon travail de thèse s'est intéressé particulièrement à la voie de signalisation cardiaque du RM. Ce travail avait deux objectifs :

- l'identification de nouvelles cibles moléculaires du RM dans le cœur
- la compréhension des effets physiopathologiques de son activation, dans le but d'identifier des mécanismes sous-tendant les effets bénéfiques des antagonistes pharmacologiques de ce récepteur en pathologie cardiaque.

La première partie de ma thèse s'est focalisée sur une approche pharmacologique en étudiant l'effet du diurétique torasémide sur la signalisation du RM cardiaque. Ce travail consistait à montrer si le torasémide pouvait bloquer le RM comme cela avait été proposé précédemment. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2013 dont je suis le premier auteur.

La seconde et majeure partie de mon travail de thèse a concerné l'étude de nouveaux gènes cibles du RM dans le cœur, à travers une approche génétique en deux temps. Une approche gène candidat à travers une étude détaillée du gène codant pour le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF, pour *connective tissue growth factor*), et une approche transcriptomique globale du cœur de souris surexprimant spécifiquement le RMh dans le cardiomyocyte et de leurs souris contrôles. L'approche gène candidat a abouti à une publication en 2013 dont je suis le deuxième auteur. L'approche transcriptomique globale a mis en évidence, quant à elle, un nouveau processus biologique modulé par l'aldostérone dans le cœur. Ce travail, dont je suis le premier auteur, a été publié début 2015.

Parallèlement à cette seconde partie de mon travail de thèse, j'ai cherché à identifier des microARNs en tant que nouvelles cibles potentielles du RM dans le cœur. Les

microARNs sont des duplex d'ARNs non-codants d'une vingtaine d'oligonucléotides qui se lient aux ARNs messagers et empêchent leurs traductions en protéines (modulations post-transcriptionnelles). Leurs identifications et leurs conséquences physiopathologiques potentielles sont à l'heure actuelle peu abordées dans cette signalisation minéralocorticoïde.

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

L'ensemble des matériels et méthodes employés est détaillé dans chacun des articles présentés dans la partie résultats. Cependant, cette partie se propose de décrire et de détailler les méthodes spécifiques utilisées dans nos approches nous paraissant en ce sens originales, ainsi que les méthodes utilisées concernant les résultats non publiés mais présentés dans la partie 3.

2.1 Modèles animaux

2.1.1 Surexpression conditionnelle du RM spécifiquement dans les cardiomyocytes

Les souris surexprimant le RMh spécifiquement dans les cardiomyocytes sont issues du croisement de deux lignées de souris transgéniques : une lignée transactivatrice α MHC-tTA qui exprime la protéine transactivatrice tTA sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde α de la myosine (α MHC, pour *α myosin heavy chain*), ciblant uniquement les cardiomyocytes ; et une lignée réceptrice tetO-RMh qui exprime le RMh sous la dépendance d'un promoteur minimal dérivé de l'opéron du gène de résistance à la tétracycline d'*Escherichia Coli*1, composé d'un promoteur minimal cytomégalovirus et de sept opérateurs sensibles à la tétracycline (tetO). Ce modèle transgénique utilise le système d'expression conditionnelle tétracycline tetOFF permettant un contrôle spatial et temporel de l'expression. La protéine transactivatrice tTA est inactive en présence d'un antibiotique dérivé des tétracyclines, la doxycycline (Dox). En absence de Dox, tTA peut se lier au promoteur contenant les tetO pour promouvoir la formation d'un complexe transcriptionnel et l'expression de la protéine d'intérêt RMh contrôlée par le promoteur α MHC spécifique du cardiomyocyte. Ce croisement permet d'obtenir dans la descendance, des souris dites double transgéniques dénommées RM-Cardio ayant intégré les deux transgènes, et des souris contrôles représentées par des souris sauvages n'ayant aucun des transgènes ainsi que des souris monotransgéniques ayant la construction réceptrice tetO-RMh ou transactivatrice α MHC-tTA. La proportion de chaque génotype est de 25% et l'ajout de Dox (2 mg/mL dilué dans 2% de sucrose pour masquer le goût amer de la Dox) dans l'eau de boisson permet d'éteindre l'expression du transgène.

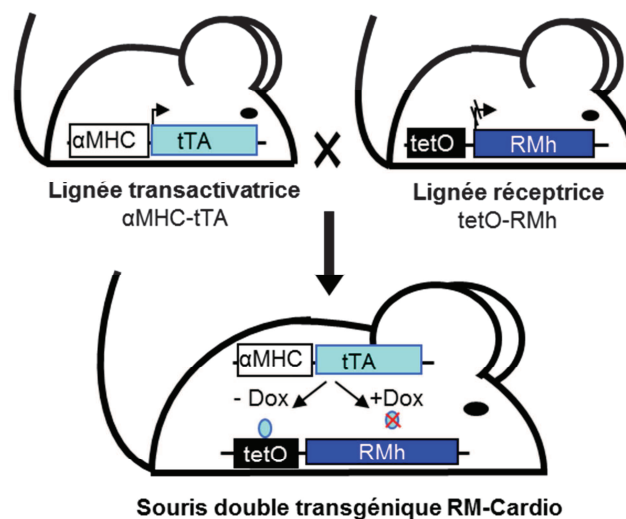


Figure 9. Schéma du modèle murin transgénique surexprimant le RMh spécifiquement dans les cardiomyocytes. Le système tétracycline est un système inductible permettant ici l'expression du gène RMh spécifiquement dans les cardiomyocytes. Seules les souris double transgéniques expriment le transgène, en absence de doxycycline. Si on veut éteindre le transgène, la doxycycline est ajoutée à l'eau de boisson. Dox : doxycycline ; α MHC : promoteur du gène codant pour la chaîne lourde α de la myosine, spécifique du cardiomyocyte; tetO : Opérateur sensible à la tétracycline; tTA : Protéine transactivatrice.

2.1.2 Protocoles

2.1.2.1 Effet de l'infusion d'aldostérone sur les souris RM-Cardio

2.1.2.1.1 Administration du traitement

Des souris mâles de quatre mois RM-Cardio et leurs contrôles sont traitées pendant une semaine soit :

- avec de l'aldostérone (Sigma-Aldrich, France) à une dose de 60 μ g/kg/jour *via* une mini-pompe osmotique d'un débit de 0,15 μ L/heure (Alzet, Etats-Unis). La pose de la mini-pompe osmotique nécessite d'anesthésier l'animal à l'aide d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et de xylasine (n= 6 pour les RM-Cardio et n= 9 pour les contrôles)
- avec de la corticostérone (Sigma-Aldrich, France) dissoute dans la β -cyclodextrine (Sigma-Aldrich, France) et administrée à une dose d'environ 5 mg/kg/jour dans l'eau de boisson dans une bouteille opaque protégeant la solution de la lumière (n= 6 pour les deux génotypes)
- non traitées (n= 7 pour les deux génotypes).

A la fin du traitement, les animaux sont pesés et sacrifiés par décapitation. Le sang est récupéré extemporanément puis le cœur est prélevé.

2.1.2.1.2 Préparation du cœur

Les cœurs sont rincés dans du tampon phosphate salin froid à 4°C (PBS, pour *phosphate buffer saline*) puis pesés à l'aide d'une balance de précision. Les oreillettes sont exclues puis les ventricules sont divisés en trois (coupes transversales) ; le milieu est congelé dans un gel *O.C.T* (CellPath, Royaume-Uni) durcissant à -20°C et utilisé pour les études immuno-histologiques tandis que la base et l'apex du cœur sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C pour l'étude de l'expression des protéines et des ARNm.

2.1.2.1.3 Extraction des ARNs totaux, réalisation et analyse du transcriptome

Le transcriptome cardiaque par puces à oligonucléotides de cinq à six souris par groupe a été effectué. Les ventricules cardiaques congelés sont broyés à l'aide de tubes à billes *Lysing Matrix D* (MP Biomedicals, Etats-Unis). L'extraction des ARNs totaux est réalisée à l'aide du kit *RNeasy mini*, par colonne d'affinité (Qiagen S.A. Courtabœuf, France). Pendant l'extraction, les échantillons sont traités avec la désoxyribonucléase de type I (*DNase I set*; Qiagen S.A. Courtabœuf, France) afin d'éviter toute contamination d'ADN génomique. A la fin de l'extraction, les ARNs sont resuspendus dans de l'eau sans trace de ribonucléases (*RNase Free water*; Qiagen S.A. Courtabœuf, France), puis dosés au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nanomètres (Implen, Allemagne). La qualité et l'intégrité des ARNs sont vérifiées avec le Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Venissieux, France). Les puces à oligonucléotides sont effectuées en utilisant le kit de souris *GE 4×44K V2* (Agilent Technologies, Etats-Unis) et les étapes de marquage des ARNs, d'hybridation et de révélation suivent les instructions du fabricant. Les résultats des différents transcriptomes sont analysés à l'aide du logiciel *Genespring* (Agilent Technologies, Etats-Unis), avec une probabilité d'erreur à 1% et un seuil de significativité $\geq 1,5$. Une analyse par *Gene Ontology via FunNet* (<http://www.funnet.info/>), est ensuite effectuée sur les gènes différentiellement exprimés. Ce logiciel permet d'associer de manière significative les transcrits par rapport à un processus biologique donné, en identifiant pour chaque transcrit un ou plusieurs thèmes biologiques caractéristiques. Le système d'annotation est celui fourni par le *Gene Ontology Consortium* et par le *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. De plus, les gènes différentiellement exprimés sont ensuite inclus dans un réseau moléculaire global développé à partir de la base de donnée du logiciel *IPA Ingenuity Systems* (Qiagen, S.A. Courtabœuf, France). Le nombre

d'interactions que chaque gène peut mettre en place avec d'autres est calculé à l'aide d'un algorithme et représenté sous forme d'un réseau de gènes.

2.1.2.2 Etude des microARNs comme cibles potentielles du RM

2.1.2.2.1 Extraction des microARNs totaux, et réalisation du miRnome

Onze souris (6 souris contrôles et 5 souris RM-Cardio non traitées, *confer* chapitre 2.1.2.1) ont été utilisées pour réaliser ces expériences sur la modulation des microARNs (miR). Les ventricules cardiaques congelés sont broyés à l'aide de tubes à billes *Lysing Matrix D* (MP Biomedicals, Etats-Unis). L'extraction des ARNs totaux (majoritairement des ARNm et contenant les microARNs) est réalisée à l'aide du kit *RNeasy mini*, par colonne d'affinité (Qiagen S.A. Courtabœuf, France). Pendant l'extraction, les échantillons sont traités avec la désoxyribonucléase de type I (*DNase I set*; Qiagen S.A. Courtabœuf, France) afin d'éviter toute contamination d'ADN génomique. A la fin de l'extraction, les ARNs sont resuspendus dans de l'eau sans trace de ribonucléases (*RNase Free water*; Qiagen S.A. Courtabœuf, France), puis dosés au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm (Implen, Allemagne). Les échantillons sont ensuite purifiés à l'aide du kit *Phase Lock Gel* (5 Prime, Allemagne), dosés à nouveau puis leur intégrité est vérifiée avec le *Bioanalyzer 2100* (Agilent technologies, Venissieux, France). L'étude de l'ensemble des microARNs transcrits (miRnome) pour chaque échantillon est effectué à partir de 600 ng d'ARN total par puces à oligonucléotides (*GeneChip miRNA 2.0 arrays*, Affymetrix, Etats-Unis), et les étapes de marquage des ARNs, d'hybridation et de révélation respectent les instructions du fabricant.

2.1.2.2.2 Analyse du miRnome

Cette étape a été réalisée en collaboration avec une équipe au Luxembourg (centre de recherche public de la santé, Luxembourg). Les niveaux d'expression des microARNs sont analysés en utilisant une technique appelée *Robust Multi-array Average*¹⁹⁵ qui permet d'éviter de sélectionner les échantillons faux positifs, ainsi qu'en effectuant une normalisation par quantile pour diminuer au maximum la variabilité entre les échantillons. Par conséquent, seuls les microARNs matures pertinents sont gardés.

Etant donné que seuls trois microARNs ont été identifiés comme différentiellement exprimés dans le cœur de souris RM-Cardio par rapport à leurs souris contrôles, une analyse comparative des miRnomes et des transcriptomes correspondants est effectuée par le test du coefficient de corrélation de Pearson. La base de données *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>) est utilisée pour réduire le nombre de faux positifs et pour sélectionner les paires ARNm : microARN montrant un coefficient de corrélation $r < -0,8$ et qui sont retrouvées dans les paires ARNm : microARN prédictives.

2.1.2.2.3 Rétrotranscription et PCR quantitative des microARNs cibles

10 ng d'ARN sont ensuite rétrotranscrits en ADNc complémentaires (ADNc) en utilisant le kit *TaqMan MicroRNA Cells-to CT* (Life Technologies, Etats-Unis). Ce processus comprend trois étapes : 30 minutes à 16°C, suivie de 30 minutes à 42°C puis 5 minutes à 85°C. L'ADNc produit est le complémentaire d'un seul microARN par réaction. En effet, cette étape nécessite l'utilisation d'amorces oligopeptidiques spécifiques d'une seule cible à la fois. Nous avons utilisé les amorces du miR-1941-5p et du miR-17 qui est exprimé de manière ubiquitaire et servant de contrôle (les amorces oligopeptidiques sont achetées chez Life Technologies mais leurs séquences ne sont pas disponibles). L'ADNc nouvellement synthétisé peut être conservé à -20°C.

L'amplification semi-quantitative en temps réel (PCR quantitative ou qPCR, pour *quantitative Polymerase Chain Réaction*) est réalisée à l'aide de l'iCycler (Biorad, Etats-Unis) à partir de 1 ng d'ADNc obtenus après l'étape de rétrotranscription. La qPCR est réalisée avec une dénaturation initiale (95°C durant 10 minutes) et 40 cycles de dénaturation (95°C durant 15 secondes), d'hybridation et d'élongation (60°C durant 1 minute). La polymérisation des amplicons produits est mesurée à la fin de chaque cycle grâce à la fluorescence émise par la sonde TaqMan (kit *Universal PCR Master Mix II, No UNG*, Life technologies, Etats-Unis). L'efficacité de chaque couple d'amorces est déterminée à l'aide d'une dilution en cascade d'un mélange d'ADNc. Le niveau relatif d'ADNc de chaque échantillon pour le gène d'intérêt est normalisé par rapport à un gène de référence, ici le miR-17, puis normalisé une deuxième fois par rapport au groupe contrôle expérimental. Les variations d'expressions sont exprimées en valeurs relatives.

2.1.2.3 Effets du torasémide *in vivo*

2.1.2.3.1 Modèle pharmacologique DOCA-Sel d'excès de minéralocorticoïde

Le modèle DOCA-Sel consiste en l'association d'une infusion chronique sous-cutanée de déoxycorticostérone acétate (hormone précurseur de l'aldostérone) et d'un ajout de sodium dans l'eau de boisson. Pour la pose du comprimé de DOCA (Innovative Research, Etats-Unis), les souris sont anesthésiées à l'aide d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et de xylazine, tondues au niveau de la région scapulaire et déposées sur un tapis chauffant maintenant leur température corporelle à 37°C. Le champ opératoire est désinfecté avec de la *Bétadine* (MEDAPharma, Suède). Une incision latérale est réalisée à travers la peau au niveau de la région scapulaire et le comprimé est placé en sous-cutané et remplacé 1 fois au bout de trois semaines. La peau est refermée à l'aide d'un fil de suture 5/0 (Ethicon, Etats-Unis). Le groupe contrôle est soumis au même protocole, avec pose d'un comprimé placebo de DOCA. Le lendemain de la pose des comprimés, l'eau de boisson est complétée avec 1% de chlorure de sodium et le régime est normal. Les souris sont pesées et sacrifiées au bout de six semaines de traitement.

Les souris mâles de quatre mois C57BL/6JRj sont réparties en 4 groupes :

- un groupe de souris contrôles avec le comprimé placebo de DOCA (Ctrl, n= 8)
- un groupe de souris DOCA avec le comprimé de DOCA diffusant une dose constante pendant 21 jours, à partir de 50 mg de composé (DOCA, n= 6)
- un groupe de souris DOCA avec ajout dans l'eau de boisson de spironolactone (Sigma-Aldrich, France) à une dose de 15 mg/kg/jour (DOCA+S, n= 7)
- un groupe de souris DOCA avec ajout dans l'eau de boisson de torasémide (CEVA, France) à une dose de 1 mg/kg/jour (DOCA+T, n= 6).

2.1.2.3.2 Extraction des ARNs totaux et rétrotranscription

Le cœur et le rein droit des souris sont préparés (*confer* chapitre 2.1.2.1.2) et congelés à -80°C. Les organes congelés sont broyés à l'aide de tubes à billes *Lysing Matrix D* (MP Biomedicals, Etats-Unis). L'extraction des ARNs totaux est réalisée avec le kit *RNeasy mini*, par colonne d'affinité (Qiagen S.A. Courtabœuf, France). Pendant l'extraction, les échantillons sont traités avec la désoxyribonucléase de type I (*DNase I set*; Qiagen S.A. Courtabœuf, France) afin d'éviter toute contamination d'ADN génomique. A la fin de l'extraction, les ARN sont resuspendus dans de l'eau sans trace de ribonucléases (*RNase Free*

water; Qiagen S.A. Courtabœuf, France), puis dosés au spectrophotomètre (Implen, Allemagne) à une longueur d'onde de 260 nm. Les ARNm sont considérés de bonne qualité si le ratio 260/280 est supérieur à 1,6. 500 ng d'ARNm sont ensuite rétrotranscrits en ADNc à l'aide de l'enzyme *SuperscriptII* (Life Technologies, Etats-Unis). L'ADNc produit est conservé à -20°C.

2.1.2.3.3 PCR quantitative

L'amplification semi-quantitative en temps réel est réalisée à l'aide de l'iCycler (Biorad, Etats-Unis) à partir de 6 ng d'ADNc obtenus après l'étape de rétrotranscription. La qPCR est réalisée avec une dénaturation initiale (95°C durant 10 minutes) et 40 cycles de dénaturation (95°C durant 15 secondes), d'hybridation et d'élongation (60°C durant 1 minute). La polymérisation des amplicons produits est mesurée à la fin de chaque cycle grâce à la fluorescence émise par l'agent intercalent *SYBR Green* (Biorad, Etats-Unis). L'efficacité de chaque couple d'amorces est déterminée à l'aide d'une dilution en cascade d'un mélange d'ADNc. Le niveau relatif d'ADNc de chaque échantillon pour le gène d'intérêt est normalisé par rapport à un gène de référence, puis normalisé une deuxième fois par rapport au groupe contrôle expérimental. Les variations d'expressions sont exprimées en valeurs relatives. Les séquences des amorces oligopeptidiques utilisées sont listées dans le Tableau 1.

Gènes cibles	Amorces sens	Amorces anti-sens
18S	CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC	TCT TGG CAA ATG CTT TCG C
ANP	GAG TGG ACT AGG CTG CAA CA	CAG TGG CAA TGT GAC CAA GC
Ccnb1	TGA TTT TGG AGG AGC CAT GGC GCT C	GCA CTC TTG CCT GTA GCT CTT GCG
Cdk1	AGT AAC GAG CCG AGC CCA GCA	TCG GCC TTG CCA GAG CGT TTG
Col I	CCC CGG GAC TCC TGG ACT T	CCC CGG GAC TCC TGG ACT T
Col III	AAC ACG AGG TCC TTC AGG TG	ATC CAT CTT TGC CAT CTT CG
CTGF	TGA CCC CTG CGA CCC ACA	TAC ACC GAC CCA CCG AAG ACA CAG
α ENaC	CGG AGT TGC TAA ACT CAA CAT C	TGG AGA CCA GTA CCG GCT
gp91 ^{PHOX}	CGC CCT TTG CCT CCA TTC TC	CCT TTC CTG CAT CTG GGT CTCC
p22 ^{phox}	TGC AGA GTT GGA CCG GGC TG	GCC ACG ATG CCC CCA GTG AT
p47 ^{phox}	GTG TCC CTG TCA CGG CCC AG	ATC TCG CCG GCC TCA ATG GG
Sgk-1	GCT CGA AGT ACC CTC ACC TA	AAG GGT TGG CGT TCA TAA GTT
TIMP-1	AGA CAC ACC AGA GAT ACC ATGA	TCC CAC AGC CTT GAA TCC TTT
Ubc	AGC CCA GTG TTA CCA CCA AG	ACC CAA GAA CAA GCA CAA GG

Tableau 1. Séquences des amorces oligopeptidiques sens et antisens utilisées chez la souris pour réaliser les PCR quantitatives. ANP : facteur atrial natriurétique; Ccnb1 : *Cyclin B1*; Cdk1 : *Cyclin-dependent kinase 1*; Col I : Collagène I; Col III : Collagène III; CTGF : *connective tissue growth factor*; α ENaC : sous-unité α du canal épithélial sodique; Sgk-1 : *Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1*; TIMP-1 : *tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-1*; Ubc : Ubiquitine C.

2.2 Modèles cellulaires

2.2.1 Lignées cellulaires

2.2.1.1 Lignée cellulaire H9C2-RM⁺

C'est une lignée cellulaire de cardiomyocytes dérivée de ventricules embryonnaires de rat et transfectée de façon stable avec le RM de rat⁶⁸. Cette lignée H9C2-RM⁺ a été développée et caractérisée par nos collaborateurs Aniko et Geza Fejes-Toth et présente des caractéristiques de cardiomyocytes comme l'expression du canal calcique de type L et de la chaîne lourde α de la myosine. Ces cellules sont cultivées dans le milieu DMEM/F12, pour *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, supplémenté avec 10% de sérum

de veau fœtal et un mélange d'antibiotiques (*pénicilline-streptomycine*, Life Technologies, Etats-Unis) jusqu'à environ 80% de confluence. Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu destéroïdé 24 heures avant les différentes stimulations. Après 24 heures de traitement, les cellules sont grattées de leurs puits et centrifugées 12 secondes à vitesse maximum (Centrifuge 5415R; Eppendorf, Etats-Unis). Le culot cellulaire est ensuite utilisé pour extraire l'ARN (le procédé est le même que celui expliqué dans les chapitres 2.1.2.1 et 2.1.2.2).

2.2.1.2 Lignée cellulaire H9C2-RM⁺/MMTV-Luciférase

La lignée cellulaire H9C2-RM⁺ a été transfectée avec une construction contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle d'une région génique du rétrovirus *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) contenant des ERH reconnus par le RM¹⁹⁶. Cette région génique du rétrovirus MMTV est clonée à l'aide du plasmide *pSP72* (Promega) selon les instructions du fabricant. Le plasmide *pSVD5Luc* (Promega) contenant le gène codant pour la luciférase (Luc) et le site de polyadénylation, possède également la construction contenant la région génique du MMTV, *via* l'utilisation de deux enzymes de restriction agissant au niveau de sites spécifiques. Cette construction MMTV-Luc est ensuite transfectée dans les cellules H9C2-RM⁺. Environ 3 millions de cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits (Becton-Dickinson, France) 24 heures avant la transfection. Dans chaque puits, 1 µg de la construction MMTV-Luc et 4 µL de *Reagent Plus* (Life Technologies, Etats-Unis) sont incubés 15 minutes à température ambiante dans 100 µL d'*Optimem* (Life Technologies, Etats-Unis) puis 3 µL de *Lipofectamine* sont ajoutés (préalablement diluée dans 100 µL d'*Optimem*). Après une nouvelle incubation de 15 minutes à température ambiante, 800 µL d'*Optimem* sont ajoutés et la réaction se déroule pendant 4 heures. Le milieu réactionnel est remplacé par le milieu de culture complet des cellules H9C2-RM⁺ et deux jours après la transfection, les clones résistants à l'antibiotique de la famille des aminoglycosides *G418* (Life Technologies, Etats-Unis) sont isolés puis amplifiés. Le clone 23, appelé donc H9C2-RM⁺/MMTV-Luc, a été utilisé dans les études sur l'activité transcriptionnelle du RM. Ces cellules sont cultivées dans le milieu DMEM/F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et un mélange d'antibiotiques (*pénicilline-streptomycine*, Life Technologies, Etats-Unis) jusqu'à environ 80% de confluence. Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu destéroïdé 24 heures avant les différentes stimulations. Après 24 heures de traitement, les cellules sont grattées de leurs puits et centrifugées 12 secondes à vitesse maximum

(Centrifuge 5415R; Eppendorf, Etats-Unis). Le culot cellulaire est ensuite utilisé pour extraire l'ARN (le procédé est le même que celui expliqué dans les chapitres 2.1.2.1 et 2.1.2.2).

2.3 Analyses statistiques

Les tests présentés ici sont ceux utilisés pour les résultats présentés dans ma thèse mais non publiés. Les résultats sont exprimés en donnant la valeur moyenne de chaque groupe plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (Moyenne \pm ESM). Pour une comparaison de 2 groupes, le test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé. Pour une comparaison de plus de 2 groupes, une analyse de la variance sur les rangs (ANOVA sur les rangs, pour *ANalysis Of Variance on ranks*) à 1 voie (effet du traitement) ou à 2 voies (effets du génotype et du traitement) suivie des post-tests de Student-Newman-Keuls ou de Dunn's est réalisée. Les différences entre groupes sont considérées significatives lorsque $P < 0.05$. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel *SigmaPlot* (V.11.0, Etats-Unis).

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Approche pharmacologique

3.1.1 Effets *in vitro* du torasémide sur la signalisation du RM cardiaque

3.1.1.1 Etat de la question

Ce travail a été mené dans le cadre d'une collaboration industrielle avec un laboratoire pharmaceutique s'intéressant aux propriétés du torasémide. Ce dernier est un diurétique de la branche ascendante de l'anse de Henlé et du tubule contourné distal, de nom chimique 1-isopropyl-3-[4-(3-méthyl-phénylamino)-pyridine]-urée. Le torasémide, comme le furosémide, inhibe la réabsorption de sodium en bloquant le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, et pourrait également se lier au RM. En effet, une étude a montré que le torasémide diminue la liaison de l'aldostérone à son récepteur cytoplasmique dans des homogénats de reins de rat¹⁹⁷. Par ailleurs, le torasémide est également impliqué dans le développement de la fibrose. Chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque, il diminue au niveau du cœur l'activité de la protéase clivant l'extrémité C-terminale du procollagène de type I, responsable de la maturation du collagène de type I¹⁹⁸. Le torasémide prévient également de manière dose-dépendante l'augmentation de l'expression du collagène III, du TGF- β et de l'aldostérone synthase dans un modèle de cardiomyopathie chez le rat¹⁹⁹. Il a aussi été montré que le TGF- β et l'aldostérone augmentent l'activité de la protéase clivant l'extrémité C-terminale du procollagène de type I *in vitro* dans des fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés²⁰⁰. L'un des mécanismes proposés expliquant les effets bénéfiques des bloqueurs du RM dans les études cliniques citées précédemment (comme RALES et EPHESUS) est la diminution de la fibrose cardiaque chez les patients insuffisants cardiaques et il a été montré que le torasémide améliore plus efficacement que le furosémide la survie des patients en insuffisance cardiaque de stade II ou III²⁰¹. Nous nous sommes donc demandé si le torasémide pouvait avoir un effet anti-RM.

3.1.1.2 Objectif de l'étude

Ce travail a eu pour objectif d'étudier les effets potentiels du torasémide sur la signalisation du RM dans le cœur. Pour répondre à cette question, nous avons testé sa capacité à bloquer le RM en comparaison à l'effet de la spironolactone, antagoniste bien connu du RM. L'étude s'est appuyée sur une série d'investigations *in vitro* et a fait l'objet d'une publication en 2013 dont je suis le premier auteur, présentée ci-dessous.

3.1.1.3 Article: The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes

Les figures et tableaux supplémentaires n'apparaissant pas dans la version publiée de l'article, ceux-ci ont donc été rajoutés à la suite du PDF.

The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes

Basile Gravez¹, Antoine Tarjus¹, Ruben Jimenez-Canino², Soumaya El Moghrabi¹, Smail Messaoudi¹, Diego Alvarez de la Rosa², Frederic Jaisser^{1,3*}

1 INSERM Unité 872, Université Pierre et Marie Curie, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **2** Department of Physiology and Institute of Biomedical Technologies, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain, **3** Centre d'Investigation Clinique, Institut Lorrain du Cœur et des Vaisseaux, Centre Hospitalier Universitaire de Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Abstract

Aldosterone binds to the mineralocorticoid receptor (MR) and exerts pleiotropic effects beyond enhancing renal sodium reabsorption. Excessive mineralocorticoid signaling is deleterious during the evolution of cardiac failure, as evidenced by the benefits provided by adding MR antagonists (MRA) to standard care in humans. In animal models of cardiovascular diseases, MRA reduce cardiac fibrosis. Interestingly diuretics such as torasemide also appear efficient to improve cardiovascular morbidity and mortality, through several mechanisms. Among them, it has been suggested that torasemide could block aldosterone binding to the MR. To evaluate whether torasemide acts as a MRA in cardiomyocytes, we compared its effects with a classic MRA such as spironolactone. We monitored ligand-induced nuclear translocation of MR-GFP and MR transactivation activity in the cardiac-like cell line H9C2 using a reporter gene assay and known endogenous aldosterone-regulated cardiac genes. Torasemide did not modify MR nuclear translocation. Aldosterone-induced MR transactivation activity was reduced by the MRA spironolactone, not by torasemide. Spironolactone blocked the induction by aldosterone of endogenous MR-responsive genes (Sgk-1, PAI-1, Orosomucoid-1, Rgs-2, Serpina-3, Tenascin-X), while torasemide was ineffective. These results show that torasemide is not an MR antagonist; its association with MRA in heart failure may however be beneficial, through actions on complementary pathways.

Citation: Gravez B, Tarjus A, Jimenez-Canino R, El Moghrabi S, Messaoudi S, et al. (2013) The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes. PLoS ONE 8(9): e73737. doi:10.1371/journal.pone.0073737

Editor: Philippe Rouet, I2MC INSERM UMR U1048, France

Received: May 8, 2013; **Accepted:** July 23, 2013; **Published:** September 9, 2013

Copyright: © 2013 Gravez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from INSERM (Institut National pour la Santé et Recherche Médicale), a CEVA company research grant, the "Centre de Recherche Industrielle et Technique" and the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain), grant BFU2010-16265 to D.A.R. B.G. and A.T. were recipients of PhD grant from the French Ministry of Research. R.J.-C. is supported by a predoctoral fellowship from Cajacanarias (Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: As mentioned in the funding sources, this work was partly supported by a grant from the CEVA company. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

Introduction

The use of loop diuretics such as furosemide and torasemide is classically included in the therapeutic arsenal for the symptomatic treatment of congestive heart failure. The TORasemide In Congestive heart failure trial (TORIC), showed that torasemide had more beneficial effects on mortality and morbidity of patients with CHF than furosemide [1]. Part of the benefit may be related to the different pharmacokinetic properties of torasemide, such as the longer half-life, the longer duration of action and the higher bioavailability as compared to furosemide. However it has also been suggested that torasemide has pharmacodynamic properties beyond its loop diuretic effect. Indeed, torasemide has specific vascular effects as compared to furosemide: it inhibits angiotensin II (AngII)-induced vasoconstriction in the aorta of Spontaneously Hypertensive Rats [2] as well as AngII-stimulated vascular smooth muscle cell growth [3]. Torasemide also inhibits thromboxane A2-induced vasoconstriction in isolated canine artery [4]. Furthermore, a possible blockade of mineralocorticoid receptor binding of aldosterone (called anti-aldosteronergic effect in the initial paper)

has been reported for torasemide by the group of Uchida in 1991: administration of a relatively high dose of torasemide significantly inhibited in vivo binding of aldosterone to its receptor in the cytoplasmic fraction of rat kidney homogenates, whereas furosemide had no effect [5]. This results led to the hypothesis that torasemide may also act as a mineralocorticoid receptor antagonist.

Indeed, inappropriate mineralocorticoid signaling has been shown to play an important role in the progression of cardiovascular (CV) disease. Aldosterone (Aldo) is a main regulator of renal sodium reabsorption with an overall effect on volume and blood pressure. Aldo binds to the mineralocorticoid receptor (MR), a transcription factor of the nuclear receptor family present in the kidney and also in non-epithelial cells [6]. New extra-renal pathophysiological effects of this hormone have been characterized, extending its actions to the CV system and inappropriate MR activation has been shown to promote cardiac fibrosis in experimental models [7]. The Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) [8], the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS)

[9] and Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF) [10] clinical trials have demonstrated that the addition of MR antagonists to standard care markedly reduced the overall and cardiovascular mortality in patients with left ventricular systolic dysfunction and mild or severe symptoms of chronic heart failure (HF) or with signs of HF after acute myocardial infarction. The beneficial effects of MR antagonists in HF are associated with a reduction of cardiac fibrosis [7].

In patients with chronic HF, torasemide has been reported to reduce myocardial fibrosis [11–13]. As this effect was not observed in furosemide-treated patients, the ability of torasemide to act on myocardial fibrosis might be related to interference with profibrotic factors such as aldosterone and AngII.

This putative anti-aldosterone/anti-mineralocorticoid receptor property of torasemide has potential therapeutic outcomes in the treatment of HF. From a clinical point of view, it is therefore important to determine whether torasemide and spironolactone, the classical mineralocorticoid receptor antagonist (MRA), have similar targets and whether these drugs should be associated to potentiate their efficacy in the treatment of HF. The aim of this study was to analyze whether torasemide acts as a MRA in cardiomyocytes, in comparison with spironolactone.

Materials and Methods

Ligand-induced MR Nuclear Translocation Assay

COS-7 is a fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue classically used for transactivation assays due to the absence of endogenous expression of MR or the related glucocorticoid receptor (GR) [14]. COS-7 cells were obtained from the American Type Culture Collection and grown in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were transiently transfected with a functional fluorescent variant of the mouse MR (MR-147-GFP) [15] using jetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturers instructions. At the time of transfection, cells grown on coverslips were transferred to medium containing charcoal-stripped serum (Lonza, Barcelona, Spain). Forty-eight hours after transfection, cells grown on coverslips were placed under an Olympus Fluoview FV1000 confocal microscope with an imaging chamber pre-heated to 37°C. For imaging experiments, culture medium was substituted by extracellular saline (10^{-3} mol/liter: NaCl, 137; KCl, 4; CaCl_2 , 1.8; MgCl_2 , 1; glucose, 10; HEPES, 10; pH 7.4). Cells were treated or not with 10^{-8} M aldosterone, 10^{-6} M torasemide (Sigma, St. Louis, MO) and 10^{-6} M spironolactone (Sigma, St. Louis, MO) and images were acquired every 2 minutes (min) for one hour. Total and nuclear fluorescence intensity was analyzed frame by frame in individual cells using the manufacturers software (Olympus). Data processing and curve fitting were performed using Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

H9C2-MR Cardiomyocyte Transactivation Assay

H9C2-MR cells is a clonal cell line of cardiomyocytes derived from the embryonic rat ventricle that stably expresses the MR [16]. H9C2-MR cells (kindly provided by A Fejes-Toth) were stably transfected with a MMTV-Luc reporter construct [17] (kindly provided by H. Richard-Foy) using lipofectamine 2000 as previously described [18]. Clone 23, thereafter referred as H9C2-MR/MMTV-Luc, was selected for further transactivation studies.

H9C2-MR/MMTV-Luc cells were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum plus antibiotic (penicillin-streptomycin; Invitrogen, Carlsbad, CA). 24 h before treatment, cells were grown in steroid-free medium.

Cells were then treated for 24 h with aldosterone, spironolactone, the GR antagonist RU 38486 (10^{-6} M; Sigma) or torasemide, alone or in combination. Luciferase activity was assayed according to the manufacturers instructions (Dual-Light® Luciferase Assay; Applied Biosystems).

Gene Expression in H9C2-MR Cells

H9C2-MR cells were treated with various concentrations (as indicated in figure legends) of aldosterone, torasemide and/or spironolactone and the expression of the MR-modulated genes was measured using quantitative RT-PCR for Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1 (Sgk-1), Orosomucoid-1, Serpina-3, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), Tenascin-X and Regulator of G protein signaling-2 (Rgs-2).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cells (4 to 8 wells per condition) using TRIZOL® reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol, and DNase-treated. Reverse transcription was performed with 2 µg of total RNA, random primers (Invitrogen) and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Transcripts levels were analyzed by real time PCR in an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) with SYBR Green I detection. The reactions were performed in duplicate for each sample using a qPCR MasterMix Plus SYBR with fluorescein (Eurogentec, Angers, France) with 5×10^{-7} M of each sense and antisense primer and 6 ng of cDNA in 15 µL total volume. The thermal cycling parameters were: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Relative expression of the mRNA was quantified using the equation described by M.W. Pfaffl [19]: $\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{-C_{\text{target}}(\text{mean control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{-C_{\text{ref}}(\text{mean control-sample})}}$. The mRNA levels were normalized for β -actin mRNA in samples obtained from cultured cells. Values in control conditions were set as 1 for each gene, and fold changes are provided on the figures. The sequences of the specific primers are detailed in Table S1.

Statistical Analysis

Results are provided as mean \pm SEM. Differences between experimental conditions were tested by the Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks test. The Newman-Keuls posthoc test was used to adjust for multiple comparisons (SigmaPlot V.11.0 software). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Effect of Torasemide on MR Translocation into the Nucleus

MR is a nuclear transcription factor. Upon ligand binding, MR shuttles from its cytoplasmic localization into the nucleus. We first analyzed the kinetics of ligand-induced MR translocation in COS-7 cells transiently transfected with the previously described MR-147-GFP functional fluorescent variant of MR [15]. It has previously been shown that under non-stimulated conditions, MR is present both in the cytoplasm and the nucleus, but addition of aldosterone induces nuclear accumulation of the receptor [20]. In cells treated with 10^{-8} M aldosterone, cytosolic MR-GFP initiated its translocation to the nucleus within minutes, with a half-maximal translocation time of approximately 18 minutes (Figure 1). In cells treated with 10^{-6} M torasemide alone (without aldosterone) no translocation of the MR-GFP was detected. Spironolactone alone (10^{-6} M), however, induced MR transloca-

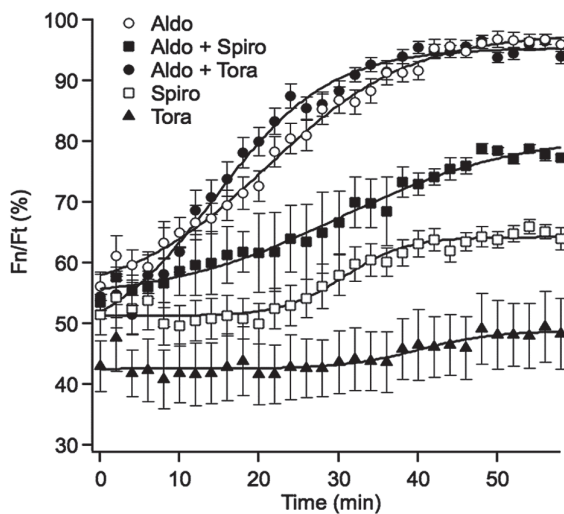


Figure 1. In vivo kinetics of nuclear translocation of MR in COS-7 cells. COS-7 cells transfected with GFP-MR were treated with 10^{-8} M aldosterone (Aldo), 10^{-8} M aldosterone + 10^{-6} M torasemide (Aldo+Tora), 10^{-8} M aldosterone + 10^{-6} M spironolactone (Aldo+Spiro), 10^{-6} M spironolactone (Spiro) or 10^{-6} M torasemide (Tora), starting at time 0. Individual points represent the average percentage fluorescent intensity of the nucleus vs. total cellular fluorescence (Fn/Ft) measured in individual cells over the indicated period of time (\pm SE, $n=16$). Data points were fitted to a sigmoid curve. doi:10.1371/journal.pone.0073737.g001

tion but with a much slower rate than aldosterone alone (Figure 1), consistently with previously published reports [20].

Simultaneous addition of 10^{-6} M torasemide and 10^{-8} M aldosterone did not change the kinetics of aldosterone-induced MR-GFP nuclear translocation while spironolactone (10^{-6} M) slowed down aldosterone-induced MR nuclear translocation (Figure 1), indicating that torasemide and spironolactone behave differently, regarding aldosterone-induced MR nuclear translocation.

Effect of Torasemide on Aldosterone-mediated MR Transactivation Activity

A transactivation assay was set up in the rat H9C2-MR cardiomyocytes cell line expressing moderate levels of rat MR [16]. The system allows rapid and efficient screening of MR-dependent transactivation, using a MMTV promoter construct that includes Hormone Response Elements leading to luciferase expression upon binding of MR to the Hormone Response Elements. In the absence of MR activation, luciferase is not expressed while upon MR activation, luciferase activity is expressed and can be easily detected (Figure 2A). This widely used reporter system allows efficient analysis of molecules with agonist/antagonist activity on the MR.

Addition of 10^{-8} M aldosterone induced a 3.5 fold increase in luciferase activity which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (10^{-6} M) but not by the GR antagonist RU 38486 (10^{-6} M) indicating specific MR activation by aldosterone in this cellular context (Figure 2B). Spironolactone or RU38486 alone have no effects (Figure 2B). Several concentrations of spironolactone or torasemide were then tested for their inhibitory activity of the aldosterone-mediated MR activation (Figure 2C). 10^{-6} M spironolactone fully inhibited the MR transactivation induced by 10^{-8} M aldosterone while torasemide has only a weak inhibitory effect that was concentration-independent. In order to unmask a potential inhibitory effect in the presence of a lower aldosterone

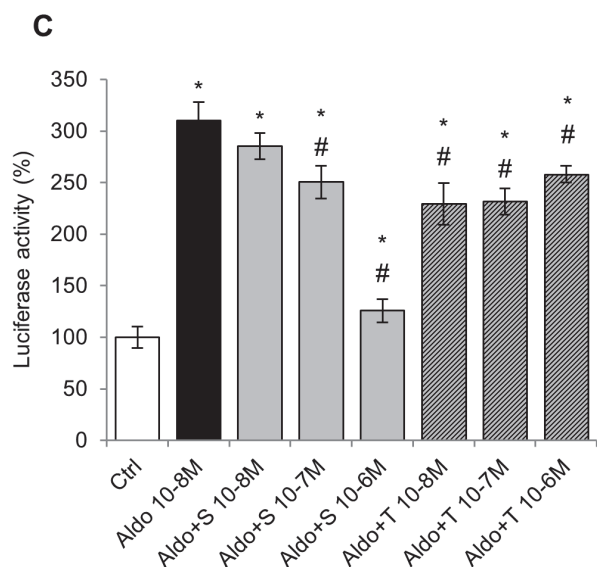
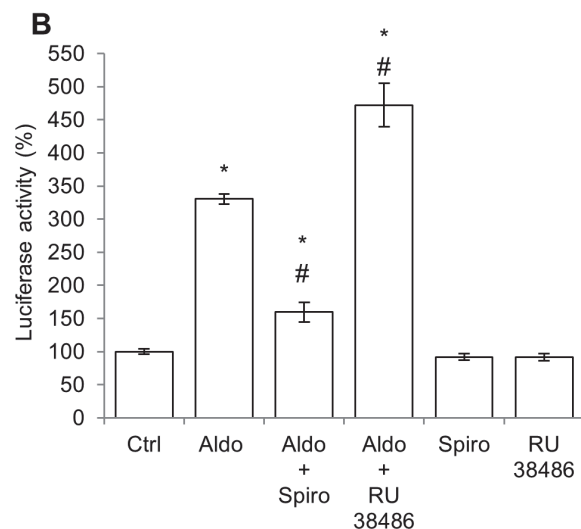
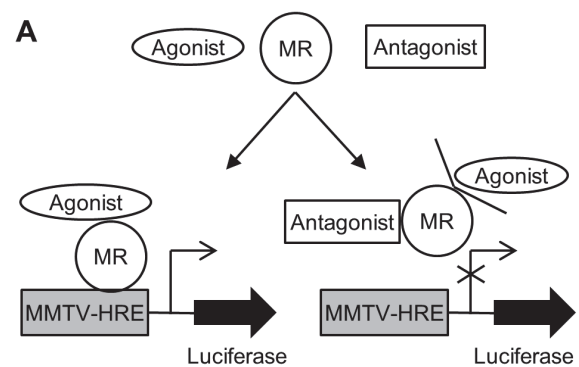


Figure 2. Effect of Torasemide on ligand-dependent transactivation activity of MR in H9C2-MR cells. A: The MMTV promoter contains Hormone Response Elements (HRE); the promoter sequence was fused to the Luciferase coding sequence. This construct was transfected into H9C2-MR cells. Upon binding of the aldosterone-MR complexes on HRE, luciferase is transcribed and light emission is enhanced, assessing MR transactivation activity. In the presence of an

MR antagonist, binding of aldosterone to MR is prevented and luciferase expression is abolished. B: 10^{-8} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity (luciferase activity) which was prevented by a 100-fold excess of the MR antagonist spironolactone (Spiro; 10^{-6} M) but not by the GR antagonist RU 38486 (RU 38486; 10^{-6} M). Each antagonist alone has no effect. Mean \pm SEM (n=8). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone. C: 10^{-8} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity, which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (S) at 10^{-6} M. Torasemide (T) has a slight antagonist effect independent of its concentration. Mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone.
doi:10.1371/journal.pone.0073737.g002

concentration, the effects of spironolactone and torasemide were also tested in the presence of 10^{-9} M aldosterone. In these conditions, torasemide has no inhibitory effect at difference with a dose-dependent antagonist activity of spironolactone (Figure S1).

Effect of Torasemide on MR-mediated Endogenous Gene Expression in H9C2-MR Cells

The MMTV promoter, despite being classically used as a reporter of MR activation, is distinct from natural targets for the MR in cardiomyocytes. It could therefore be argued that activation/antagonism of MR may be different in a natural cell context. We took advantage of our previous work that identifies MR-modulated cardiac genes [21] to test the effect of torasemide, in comparison to spironolactone, in H9C2-MR cells. We analyzed the expression of the Serum- and glucocorticoid- inducible kinase-1, Sgk-1 (regulated by corticosteroid hormones in kidney cells), Orosomucoid-1 (an inflammatory protein), Serpina-3, PAI-1 and Tenascin-X (genes of the extra-cellular matrix remodeling) and Rgs-2 (Regulator of G protein signaling-2). Torasemide (10^{-6} M) alone significantly decreased the basal expression (in absence of serum and aldosterone) of Orosomucoid-1 and Tenascin-X, which is indeed very weakly expressed in cardiomyocytes in the absence of aldosterone stimulation (Figure S2). We next tested the antagonist activity of torasemide. As depicted in Figure 3, in the presence of 10^{-8} M aldosterone, spironolactone partly or fully inhibited aldosterone-induced expression of aldosterone/MR target genes while torasemide had no effect, even at a high concentration (10^{-6} M). Similar effects were observed when a lower concentration of aldosterone was used (10^{-9} M) (Figure 4) indicating that the absence of antagonist activity of torasemide was not due to unfavorable competition with a high aldosterone concentration. Interestingly, the potency of spironolactone varies among the analyzed target genes: PAI-1, Orosomucoid-1 and Serpina-3 were inhibited with 10 fold lower spironolactone concentration (10^{-8} M) than Sgk-1, Rgs-2 and Tenascin-X (Figure 4). We next evaluated whether a torasemide (10^{-6} M) could enhance the sensitivity of MR toward spironolactone in aldosterone-treated H9C2-MR cells. To this purpose, we treated cells with a low dose of spironolactone (10^{-8} M) that was not sufficient to reduce the increase of gene expression with 10^{-8} M aldosterone. Addition of torasemide did not sensitize the MR to spironolactone as shown by the analysis of aldo-induced gene expression of Orosomucoid-1, Sgk-1 and Tenascin-X (Figure S2).

Discussion

Spectacular progress has been made in the treatment of heart failure during the last decades. Combining drugs of different therapeutic classes such as diuretics, beta-blockers, Angiotensin Converting Enzyme inhibitors and Angiotensin receptor blockers led to major clinical benefits on morbidity-mortality. Despite these

progresses, heart failure remains a life-threatening disease, requiring further improvement of the therapeutic strategies. Blocking the mineralocorticoid receptor has been proposed and validated as an additional tool: clinical studies in patients with severe or mild heart failure demonstrated an additional benefit of MRAs administered on the top of standard therapy [8–10]. The results of these trials led to changes in the therapeutic guidelines [22,23]. One of the proposed underlying mechanisms explaining this clinical benefit relies on the decrease of myocardial fibrosis. Indeed targeting cardiac fibrosis would impact the severity of heart disease by reducing stiffness, improving cardiac hemodynamics and reducing pro-arrhythmic triggers. Cardiac anti-fibrotic therapy includes MRAs (such as spironolactone or eplerenone) and, more recently, the diuretic torasemide. Whether MRAs and torasemide act on the same pathways or not needs to be carefully addressed. Indeed if these therapeutic classes act on different pathways, it may be useful to use both of them which may lead to additive beneficial effects.

It has been proposed that torasemide has some mineralocorticoid receptor antagonist properties and torasemide is considered as an “anti-aldosterone” compound [5]. In order to test the potential MR antagonist property of torasemide, we selected several genes of different functional classes (inflammation, extracellular matrix remodelling, signalling) that were previously shown, by ourselves and by others, to be regulated by aldosterone in cardiomyocytes [16,21]. Rgs-2 (Regulator of G protein signaling-2) is a multifunctional signaling regulator and exerts GTPase-activating protein activities. Many signals that regulate cardiomyocyte growth, differentiation, and function are mediated via heterotrimeric G proteins, which are controlled by Rgs proteins [24]. Three aldosterone-regulated genes have close connections with the regulation of the extra-cellular matrix: Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), a member of the SERPIN family, is the major physiological inhibitor of tissue-type Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator, that activate plasminogen to its active form plasmin and lead to fibrinolysis. In addition to its serine protease inhibitor function, PAI-1 also alters cell/matrix interactions by binding to vitronectin [25]; Serpina-3 (also named $\alpha 1$ -antichymotrypsine) is a serine protease inhibitor with multiple functions including maturation of pro-MMP9 and wound healing, regulation of apoptosis and inflammation [26]; Tenascin-X belongs to the family of matricellular proteins. These proteins are extracellular matrix proteins that modulate cell-matrix interactions and collagen accumulation and organization, but do not have a direct structural role [27]. Tenascin-X is an essential regulator of collagen deposition by fibroblasts [28] and is up-regulated during fibrosis after tissue injury [27]. Orosomucoid-1 is an acute phase protein that is induced by pro-inflammatory cytokines and glucocorticoids [29]. Interestingly, elevated plasma level of Orosomucoid-1 is considered as a cardiovascular risk factor [30].

The data reported in the present study clearly do not support the concept that torasemide acts as an antagonist of the MR. Indeed using different approaches, we showed that torasemide does not behave as spironolactone, a prototypic MRA: it did not affect nuclear translocation of MR nor inhibited aldosterone-induced up-regulation of various mineralocorticoid receptor target genes in cardiomyocytes. These results are not compatible with the study of Uchida et al. [5] proposing that torasemide acts as a competitive antagonist of aldosterone binding in kidney homogenates. A tissue-specific effect of torasemide on MR binding in kidney but not cardiomyocyte is a possibility but, to our knowledge, such tissue-specific actions of MR antagonists have not been reported.

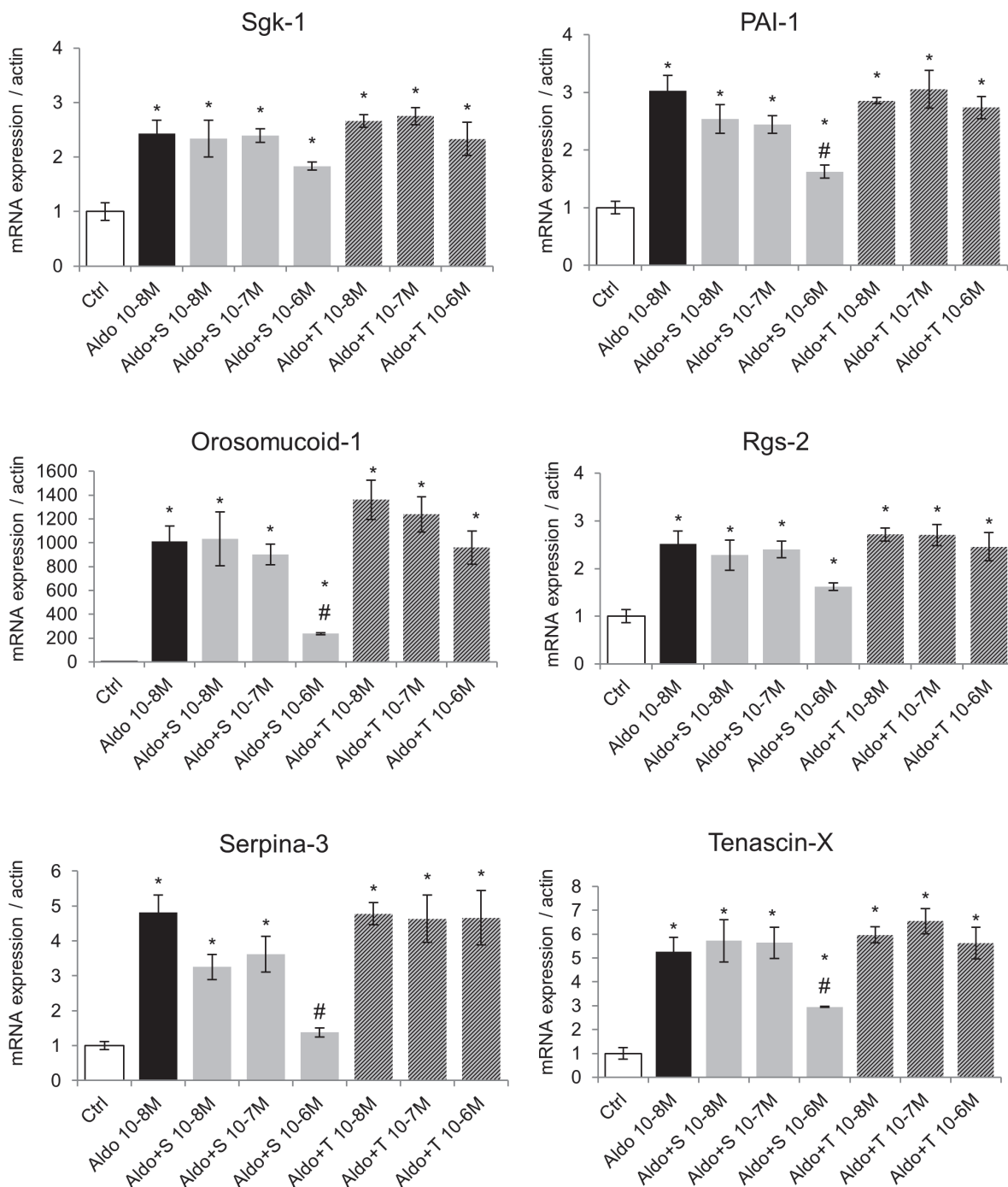


Figure 3. Torasemide does not act as a MR antagonist for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells in the presence of 10^{-8} M aldosterone. 10^{-8} M aldosterone (Aldo) increased expression of the aldosterone-targets genes Sgk-1, PAI-1, Orosomucoid-1, Rgs-2, Serpina-3 and Tenascin-X. Addition of increasing doses of spironolactone (A+S) inhibited aldosterone-induced gene expression. In contrast, increasing concentrations of torasemide (A+T) had no antagonistic effect. Mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone. doi:10.1371/journal.pone.0073737.g003

From our results and previously published data, spironolactone not only competes with aldosterone for binding to MR, but it also induces ligand-dependent conformational changes that uncover nuclear localization signals, eliciting MR trafficking to the nucleus. The slower kinetics of this process when compared to aldosterone-induced nuclear translocation may reflect differences in ligand

binding kinetics and ligand-induced co-chaperone release from the aporeceptor complex [31]. Therefore, spironolactone is not a classic competitive antagonist of MR. It has been proposed that the inhibitory effect of spironolactone on MR is based on the induction of an altered receptor conformation, which in turn disrupts co-activator recruitment [32]. This could be consistent

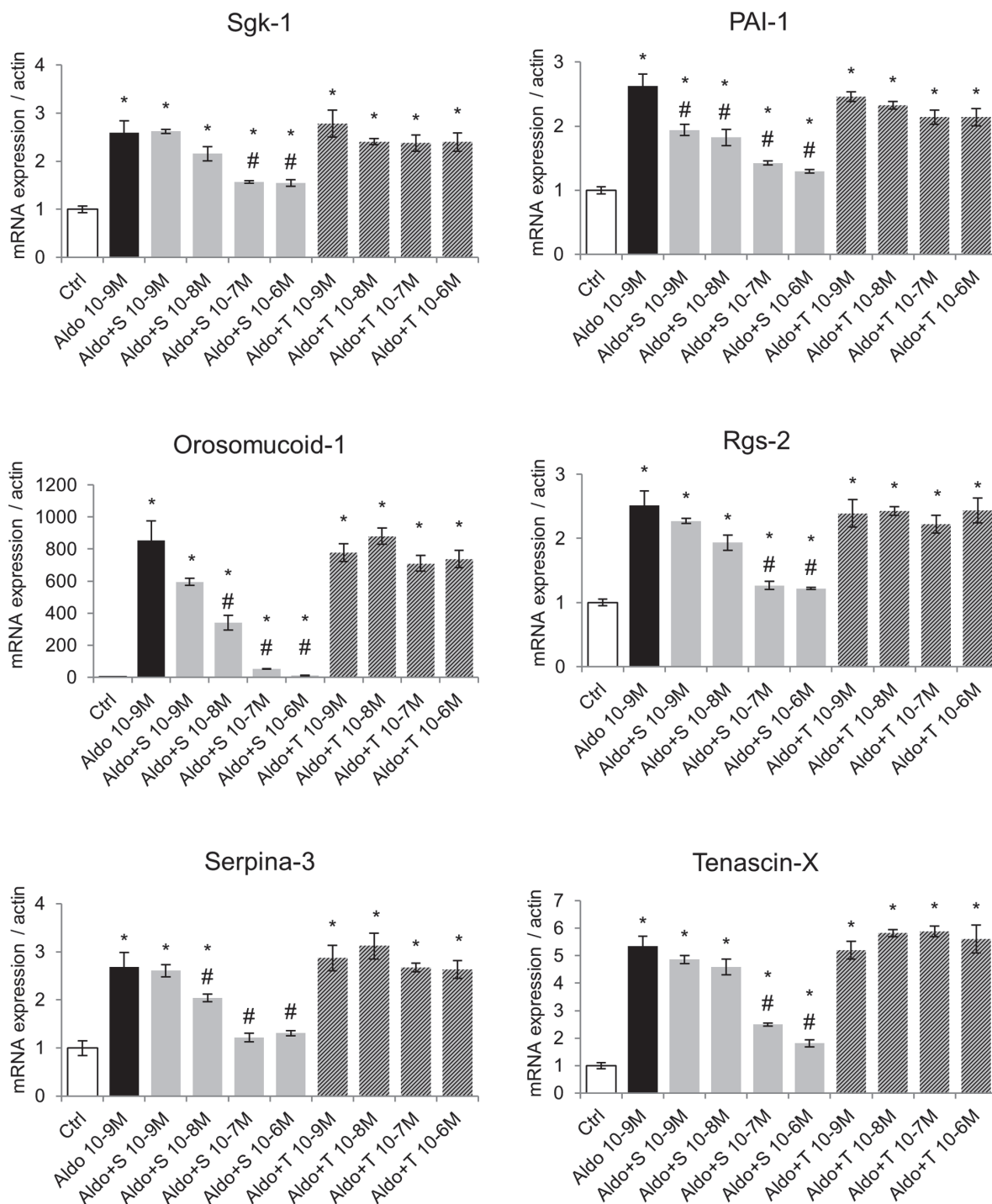


Figure 4. Torasemide does not act as a MR antagonist for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells in the presence of 10^{-9} M aldosterone. 10^{-9} M aldosterone (Aldo) increased expression of the aldosterone-targets genes Sgk-1, PAI-1, Orosomucoid-1, Rgs-2, Serpina-3 and Tenascin-X. Addition of increasing doses of spironolactone (A+S) inhibited aldosterone-induced gene expression. In contrast, increasing concentrations of torasemide (A+T) had no antagonistic effect. Mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone. doi:10.1371/journal.pone.0073737.g004

with recent data demonstrating that spironolactone behaves as an inverse agonist of MR [33,34] suggesting that spironolactone beneficial therapeutic actions involve the induction of MR-dependent effects that are opposite to those induced by natural agonists such as aldosterone. The molecular basis for the inverse

agonist activity is unknown. It has been proposed that spironolactone can act as an MR agonist in a cell- and promoter-specific fashion [35], but the identities of specific target genes that may be regulated by spironolactone-MR complexes remain to be elucidated.

Torasemide, at micromolar concentrations, has also been reported to inhibit aldosterone secretion *in vitro* by adrenal cells from rats, cows and guinea pig upon stimulation by potassium and AngII (among other classical aldosterone secretagogues), while furosemide has no effect on adrenal aldosterone secretion [36]. In human, torasemide has been reported to inhibit transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure [37], an effect which might be due to inhibition of local aldosterone synthesis, that has been reported to be increased in human heart failure [38]. *In vivo* however, in both human and dogs, torasemide, as other diuretics, increases plasma aldosterone levels to compensate sodium loss [39,40,41]. Therefore, if MR is not properly antagonized, torasemide administration would likely increase MR activation through the rise in plasma aldosterone levels rather than decrease MR-mediated pathways.

Both torasemide and spironolactone have been shown to be efficient in patients and in dogs with HF [1,42]. One can speculate that adding torasemide to spironolactone in HF would be beneficial. Torasemide has a strong diuretic effect and an anti-fibrotic effect for which a mechanism has been recently proposed: torasemide inhibits procollagen type I carboxy-terminal proteinase activation as well as lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure [11,12], resulting in normalization of left ventricular stiffness. MRAs act at different levels: MRAs prevent electrophysiological abnormalities, oxidative stress and extracellular matrix remodeling as well as inflammation [7]. Beneficial additive effects may therefore occur in patients. Such therapeutic benefit in HF remains to be addressed.

Perspectives

Taken together, these results demonstrate that the diuretic torasemide does not act as a mineralocorticoid receptor antagonist as previously proposed. This suggests that the use of torasemide together with an MR blocker could further enhance the anti-fibrotic effects of these therapeutics, especially in heart failure. This should be particularly considered since torasemide increased aldosterone, the ligand of the MR, due to its effects of the renal Na

balance. This should be analyzed in dedicated experimental and clinical studies.

Supporting Information

Figure S1 Effect of Torasemide on Ligand-dependent transactivation activity of MR in H9C2-MR cells. 10^{-9} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity, which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (S) at 10^{-7} M while torasemide (T) has no effect. Mean \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone. (TIF)

Figure S2 Torasemide did not enhance MR sensitivity to a low dose of spironolactone for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells. A low dose of spironolactone (10^{-8} M) did not block aldosterone-induced response of Orosomucoid-1, Sgk-1 and Tenascin-X. Torasemide (10^{-6} M) did not confer higher sensitivity to the spironolactone antagonist when spironolactone and torasemide were combined. Mean \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl). (TIF)

Table S1 Sequences of the specific primers. Actin: β -actin; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; Rgs-2: Regulator of G protein signaling-2; Sgk-1: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1. (TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Aniko Naray-Fejes-Toth for the H9C2-MR cells.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BG SEM FJ. Performed the experiments: BG RJC SEM. Analyzed the data: BG SM DAR FJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: BG AT RJC SEM. Wrote the paper: BG FJ. Obtained permission for use of cell line: FJ DAR.

References

- Cosin J, Diez J (2002) Torasemide in chronic heart failure: results of the TORIC study. *Eur J Heart Fail* 4: 507–513.
- Fortuno A, Muniz P, Ravassa S, Rodriguez JA, Fortuno MA, et al. (1999) Torasemide inhibits angiotensin II-induced vasoconstriction and intracellular calcium increase in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34: 138–143.
- Muniz P, Fortuno A, Zalba G, Fortuno MA, Diez J (2001) Effects of loop diuretics on angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell growth. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 1: 14–17.
- Uchida T, Kido H, Yamanaga K, Okita M, Watanabe M (1992) A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A2-induced contraction in the isolated canine coronary artery. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45: 121–124.
- Uchida T, Yamanaga K, Nishikawa M, Ohtaki Y, Kido H, et al. (1991) Anti-aldosterone effect of torasemide. *Eur J Pharmacol* 205: 145–150.
- Farman N, Rafestin-Oblin ME (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F181–192.
- Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C, Jaissier F (2012) Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol* 350: 266–272.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, et al. (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709–717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, et al. (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348: 1309–1321.
- Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, et al. (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364: 11–21.
- Lopez B, Querejeta R, Gonzalez A, Beaumont J, Larman M, et al. (2009) Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension* 53: 236–242.
- Lopez B, Gonzalez A, Beaumont J, Querejeta R, Larman M, et al. (2007) Identification of a potential cardiac antifibrotic mechanism of torasemide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50: 859–867.
- Lopez B, Querejeta R, Gonzalez A, Sanchez E, Larman M, et al. (2004) Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 43: 2028–2035.
- Ou XM, Storrer JM, Kushwaha N, Albert PR (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem* 276: 14299–14307.
- Aguilar-Sanchez C, Hernandez-Diaz I, Lorenzo-Diaz F, Navarro JF, Hughes TE, et al. (2012) Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 153: 3517–3525.
- Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A (2007) Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: clues to cardiac remodeling? *Endocrinology* 148: 1502–1510.
- Gouilleux F, Sola B, Couette B, Richard-Foy H (1991) Cooperation between structural elements in hormone-regulated transcription from the mouse mammary tumor virus promoter. *Nucleic Acids Res* 19: 1563–1569.
- Ouvrard-Pascaud A, Puttini S, Sainte-Marie Y, Athman R, Fontaine V, et al. (2004) Conditional gene expression in renal collecting duct epithelial cells: use of the inducible Cre-lox system. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F180–187.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Fejes-Toth G, Pearce D, Naray-Fejes-Toth A (1998) Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2973–2978.
- Latouche C, Sainte-Marie Y, Steenman M, Castro Chaves P, Naray-Fejes-Toth A, et al. (2010) Molecular signature of mineralocorticoid receptor signaling in

- cardiomyocytes: from cultured cells to mouse heart. *Endocrinology* 151: 4467–4476.
22. Butler J, Ezekowitz JA, Collins SP, Givertz MM, Teerlink JR, et al. (2012) Update on aldosterone antagonists use in heart failure with reduced left ventricular ejection fraction. Heart Failure Society of America Guidelines Committee. *J Card Fail* 18: 265–281.
23. Taylor J (2012) The 2012 ESC Guidelines on Heart Failure. *Eur Heart J* 33: 1703–1704.
24. Riddle EL, Schwartzman RA, Bond M, Insel PA (2005) Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? *Circ Res* 96: 401–411.
25. Lijnen HR (2005) Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 3: 35–45.
26. Gooptu B, Lomas DA (2009) Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem* 78: 147–176.
27. Schellings MW, Pinto YM, Heymans S (2004) Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res* 64: 24–31.
28. Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, et al. (2002) Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat Genet* 30: 421–425.
29. Mackiewicz A, Mackiewicz K (1995) Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconj J* 12: 241–247.
30. Engstrom G, Hedblad B, Tyden P, Lindgarde F (2009) Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with increased incidence of heart failure: a population-based cohort study. *Atherosclerosis* 202: 617–622.
31. Couette B, Marsaud V, Baulieu EE, Richard-Foy H, Rafestin-Oblin ME (1992) Spironolactone, an aldosterone antagonist, acts as an antiglucocorticosteroid on the mouse mammary tumor virus promoter. *Endocrinology* 130: 430–436.
32. Rogerson FM, Yao YZ, Smith BJ, Dimopoulos N, Fuller PJ (2003) Determinants of spironolactone binding specificity in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 31: 573–582.
33. Mihailidou AS, Loan Le TY, Mardini M, Funder JW (2009) Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. *Hypertension* 54: 1306–1312.
34. Stier CT Jr (2009) Mineralocorticoid receptors in myocardial infarction. *Hypertension* 54: 1211–1212.
35. Massaad C, Lombes M, Aggerbeck M, Rafestin-Oblin ME, Barouki R (1997) Cell-specific, promoter-dependent mineralocorticoid agonist activity of spironolactone. *Mol Pharmacol* 51: 285–292.
36. Goodfriend TL, Ball DL, Oelkers W, Bahr V (1998) Torsemide inhibits aldosterone secretion in vitro. *Life Sci* 63: PL45–50.
37. Tsutamoto T, Sakai H, Wada A, Ishikawa C, Ohno K, et al. (2004) Torasemide inhibits transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 44: 2252–2253.
38. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, Satoh H, Akatsu T, et al. (2002) Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond)* 102: 381–386.
39. Hori Y, Takusagawa F, Ikada H, Uechi M, Hoshi F, et al. (2007) Effects of oral administration of furosemide and torsemide in healthy dogs. *Am J Vet Res* 68: 1058–1063.
40. Yamato M, Sasaki T, Honda K, Fukuda M, Akutagawa O, et al. (2003) Effects of torasemide on left ventricular function and neurohumoral factors in patients with chronic heart failure. *Circ J* 67: 384–390.
41. Uechi M, Matsuoka M, Kuwajima E, Kaneko T, Yamashita K, et al. (2003) The effects of the loop diuretics furosemide and torasemide on diuresis in dogs and cats. *J Vet Med Sci* 65: 1057–1061.
42. Oyama MA, Peddle GD, Reynolds CA, Singletary GE (2011) Use of the loop diuretic torsemide in three dogs with advanced heart failure. *J Vet Cardiol* 13: 287–292.

Figure S1

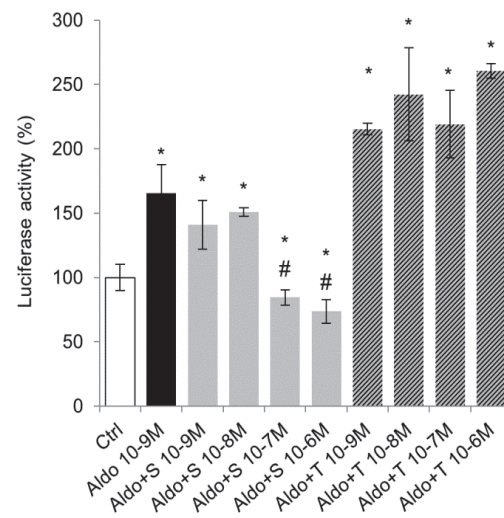


Figure S1. Effect of Torasemide on Ligand-dependent transactivation activity of MR in H9C2-MR cells. 10^{-9} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity, which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (S) at 10^{-7} M while torasemide (T) has no effect. Mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone.

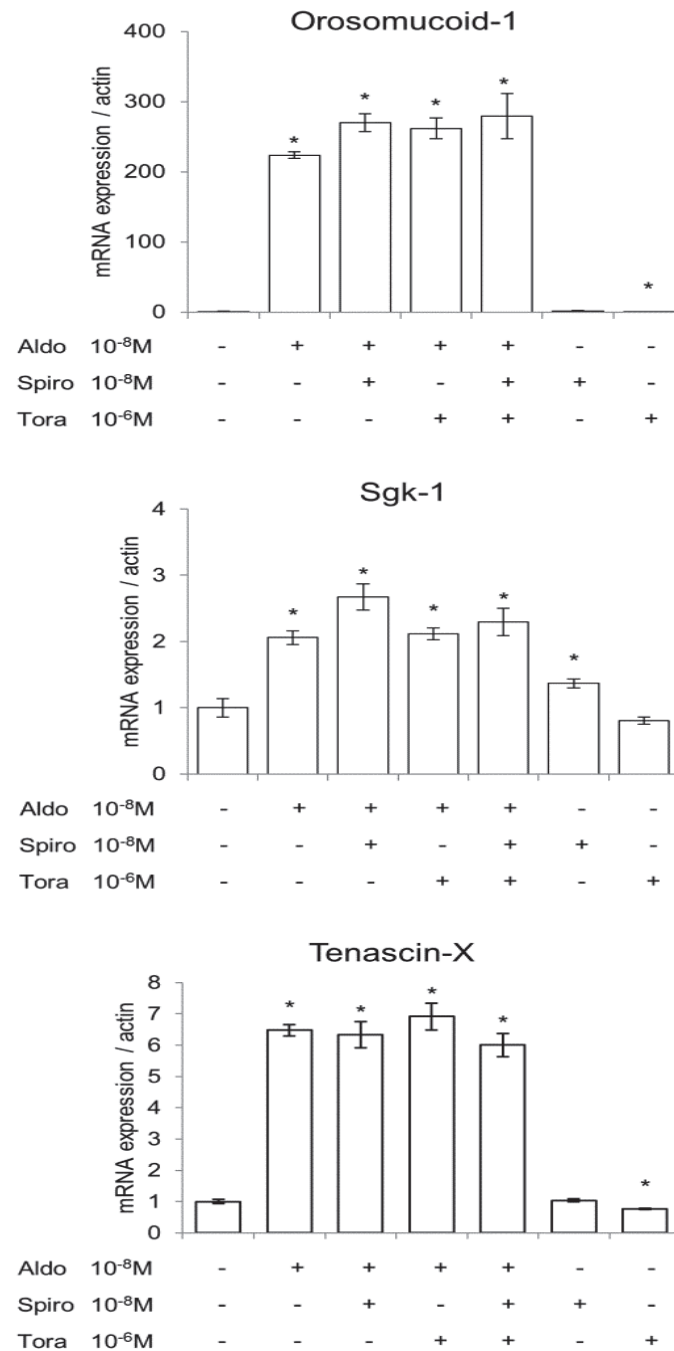
Figure S2

Figure S2. Torasemide did not enhance MR sensitivity to a low dose of spironolactone for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells. A low dose of spironolactone (10⁻⁸ M) did not block aldosterone-induced response of Orosomucoid-1, Sgk-1 and Tenascin-X. Torasemide (10⁻⁶ M) did not confer higher sensitivity to the spironolactone antagonist when spironolactone and torasemide were combined. Mean ± SEM (n=4). **p* < 0.05 vs control (Ctrl).

Table S1

Genes	Forward	Reward
Actin	GCC GGG ACC TGA CAG ACT A	GGC CAT TCT TTG CTC GAA
PAI-1	GC CTC CTC ATC CTG CCT AAG T	TG TGC CGC TCT CGT TCA CCT C
Orosomucoid-1	GCA TGG CGC TGC ACA TGG TT	TGC TTG AAC ACG GGG TCT CGG A
Rgs-2	AA GAC CCG TTT GAG CTA TTT C	GA ATG CAG CAA GCC CAT ATT T
Serpina-3	AGA CAA GGG GAC ACA ACT GG	GAG ATG CTA AGT GGG GAG AA
Sgk-1	GC TCG AAG TAC CCT CAC CTA	AGG GGT TGG CGT TCA TAA GTT
Tenascin-X	CG TGT TCG CCC AGT ATG ACT T	AT TGA GAT TGG CGT AGT GAC A

Table S1. Sequences of the specific primers. Actin : *β-actin*; PAI-1 : *Plasminogen Activator Inhibitor-1*; Rgs-2 : *Regulator of G protein signaling-2*; Sgk-1 : *Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1*.

3.1.1.4 Conclusions de l'étude et discussion

Cette étude, en utilisant trois approches différentes, démontre que le torasémide n'agit pas comme un antagoniste du RM. Il a en effet été montré que:

- le torasémide n'affecte pas la translocation nucléaire du RM après son activation par l'aldostérone dans la lignée cellulaire de fibroblastes de rein COS-7
- le torasémide n'agit pas sur l'activité transcriptionnelle du RM dans la lignée cellulaire de cardiomyocytes H9C2-RM⁺ dérivée de ventricules embryonnaires de rat et transfectée avec le RM
- le torasémide ne diminue pas l'expression de gènes cibles endogènes du RM dans cette même lignée de cardiomyocytes.

Nos résultats suggèrent que le torasémide n'affecte pas la liaison de l'aldostérone au RM, contrairement à l'observation du groupe d'Uchida *et al.*¹⁹⁷ démontrant que le torasémide bloque la liaison de l'aldostérone à son récepteur dans des homogénats de rein *in vivo*. Nos travaux ont été réalisés *in vitro* sur des cellules COS-7 (pour l'étude de la translocation nucléaire du RM) et des cellules H9C2-RM⁺. Il est donc possible que le blocage du RM par le torasémide soit spécifique d'un type cellulaire donné, bien que de telles propriétés des antagonistes du RM n'aient pas encore été rapportées.

L'effet natriurétique du torasémide entraîne par compensation une augmentation de l'aldostéronémie *in vivo*, montrée chez le chien²⁰² et chez des patients en insuffisance

cardiaque de stade II ou III²⁰³. Le groupe d'Uchida *et al.* a aussi montré que le torasémide induit une diminution de l'excrétion de potassium dans les urines en comparaison avec le furosémide, compatible avec un effet anti-aldostérone du torasémide¹⁹⁷. En réponse à ce diurétique, l'aldostéronémie augmente pour maintenir la balance hydrosodée et l'excrétion de potassium est également induite. Mais si le torasémide empêche les effets de l'aldostérone, la réabsorption sodique *via* le RM est inhibée et l'augmentation de l'excrétion de potassium pourrait être prévenue. Cependant, nos résultats indiquent clairement que le torasémide ne bloque pas les gènes cibles du complexe aldostérone/RM dans le cœur. Par ailleurs, le torasémide diminue la sécrétion d'aldostérone dans les cellules de la zone glomérulaire des glandes surrénales de rat, de vache ou bien de cochon d'inde, préalablement stimulées par l'angiotensine II ou le potassium²⁰⁴. Au contraire, le furosémide n'exerce aucun effet sur la sécrétion d'aldostérone dans ces cellules. L'ensemble de ces données suggère donc que le torasémide peut non seulement diminuer la fibrose cardiaque et certains marqueurs impliqués dans le remodelage matriciel, mais aussi interférer avec des facteurs humoraux tels que l'aldostérone, sans concerner sa liaison avec le RM.

Pour tester l'effet anti-RM du torasémide, nous avons utilisé des gènes connus, dans notre laboratoire, pour être des cibles du complexe aldostérone/RM dans le cardiomyocyte. Ces gènes sont impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire, étant un phénomène prépondérant dans la mise en place et le maintien de la fibrose. Il est connu que PAI-1, (protéase de la famille des serpin, pour *serine protease inhibitors*), altère l'interaction cellules - matrice extracellulaire en se liant à la vitronectine²⁰⁵. Une autre serpin, *Serpina-3*, est impliquée dans la régulation de l'apoptose et de l'inflammation, mais aussi dans la maturation de la protéine précurseur de la MMP-9, la pro-MMP-9²⁰⁶. Nous nous sommes également intéressés à la *Tenascin-X*, protéine de la matrice extracellulaire modulant l'interaction entre les cellules et la matrice ainsi que le dépôt de collagène dans l'interstitium²⁰⁷. Son rôle dans l'accumulation du collagène est démontré chez des souris déficientes en *Tenascin-X* qui présentent un contenu en collagène plus faible que chez leurs souris contrôles²⁰⁸. Le statut inflammatoire étant une étape clé dans le développement de la fibrose, l'expression d'*Orosomucoid-1* a été également analysée, car cette protéine est induite par des cytokines pro-inflammatoires et les glucocorticoïdes²⁰⁹. Les concentrations de spironolactone (jusqu'à 10^{-6} M) utilisées se sont montrées efficaces pour bloquer le RM, permettant de comparer ses effets à ceux du torasémide. Ainsi, nous avons montré que dans le cardiomyocyte, le torasémide ne prévient pas l'augmentation par l'aldostérone de gènes impliqués dans la fibrose.

En conclusion, nos travaux n'ont pas montré de modulation de gènes, faisant partie de la signalisation minéralocorticoïde, par le torasémide. Par contre, son effet diurétique entraîne en retour une augmentation de l'aldostéronémie, il possède des propriétés anti-fibrosantes et il est montré comme bénéfique dans l'évolution de l'insuffisance cardiaque de stade II ou III chez l'homme²⁰¹. En bloquant le RM cardiaque, la spironolactone agit quant à elle sur plusieurs niveaux comme les paramètres électrophysiologiques, le stress oxydatif, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'inflammation. Dans ce contexte, nos résultats suggèrent fortement qu'une association du torasémide et de la spironolactone pourrait être envisageable dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Néanmoins, des études expérimentales et cliniques complémentaires sont souhaitables pour analyser les bénéfices thérapeutiques possibles.

3.1.2 Effets *in vivo* du torasémide sur la signalisation du RM cardiaque

3.1.2.1 Etat de la question

Ce travail a été effectué à la suite de l'étude *in vitro*, pour compléter cette dernière et déterminer l'effet du torasémide dans un système intégré. Pour ce faire, nous avons soumis 27 souris C57BL/6JRj au modèle DOCA-Sel pendant 6 semaines.

3.1.2.2 Objectif de l'étude

Le but de ce travail a été de montrer si le torasémide peut diminuer voire prévenir totalement certains effets délétères induits par le modèle DOCA-Sel sur le cœur de souris. L'expression de gènes impliqués dans le remodelage matriciel et le stress oxydatif, dont certains sont spécifiquement induits par la voie de signalisation du RM, a été analysée dans le cœur. Comme dans l'étude *in vitro*, l'efficacité du blocage du RM par le torasémide a été comparée à celle de la spironolactone.

3.1.2.3 Protocole d'activation du RM *in vivo*

	Ctrl	DOCA	DOCA+S	DOCA+T
Nombre	8	6	7	6
Masse corporelle (g)	30,88 ± 0,40	30,50 ± 0,56	30,43 ± 0,72	29,00 ± 0,37
Longueur du tibia (mm)	17,87 ± 0,36	18,14 ± 0,07	17,61 ± 0,23	17,84 ± 0,32
Poids du cœur/Longueur du tibia (mg/mm)	9,04 ± 0,27	10,47 ± 0,30	10,07 ± 0,30	8,40 ± 0,28 #
Poids du rein gauche/Longueur du tibia (mg/mm)	16,81 ± 0,40	26,33 ± 0,98 *	25,30 ± 0,45 *	24,09 ± 1,12

Tableau 2. Paramètres physiologiques des souris soumises au modèle DOCA-Sel. Ctrl: souris contrôles; DOCA : souris uninephrectomisées, traitées à la DOCA et avec de la boisson salée; DOCA+S: souris DOCA traitées avec la spironolactone; DOCA+T: souris DOCA traitées avec le torasémide ; * $p < 0,05$ vs Ctrl; # $p < 0,05$ vs DOCA.

Le modèle DOCA-Sel seul ou avec l'ajout de spironolactone ou de torasémide ne modifie pas le poids du corps des animaux (Tableau 2). Le modèle DOCA-Sel induit seulement une hypertrophie rénale qui est également présente chez les souris DOCA+S. L'expression de la sous-unité α du canal épithélial sodique (α ENaC), cible du complexe aldostérone/RM au niveau du néphron distal, est doublée chez les souris DOCA par rapport aux souris contrôles et ni la spironolactone, ni le torasémide n'ont d'effet sur cette modulation d'expression (Figure 10).

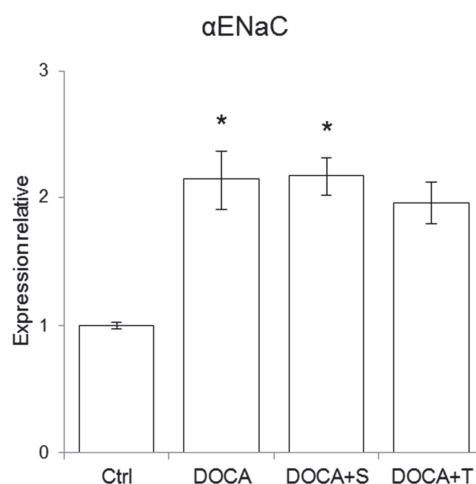


Figure 10. Effet du torasémide sur l'expression rénale de la sous-unité α du canal épithélial sodique ENaC chez des souris soumises à un modèle d'activation minéralocorticoïde. Ctrl: souris contrôles; DOCA: souris uninephrectomisées, traitées à la DOCA et avec de la boisson salée; DOCA+S: souris DOCA traitées avec la spironolactone; DOCA+T: souris DOCA traitées avec le torasémide. * $p < 0,05$ vs Ctrl.

3.1.2.4 Le torasémide diminue l'expression de certains gènes participant au remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque

L'expression relative de l'ARNm de Sgk-1 dans le cœur est augmentée dans le modèle DOCA-Sel comparée aux souris contrôles. Par contre, son expression est diminuée partiellement chez les souris DOCA+S ou DOCA+T. Les gènes codant pour des protéines influençant le remodelage matriciel cardiaque ont été analysés. Les expressions du collagène III et de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases matricielles de type 1 (TIMP-1, pour *tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-1*) sont augmentées chez les souris DOCA par rapport aux souris contrôles, alors qu'elles sont partiellement inhibées chez les souris DOCA+S et DOCA+T (Figure 11). L'augmentation du collagène I est totalement diminuée chez les souris DOCA+T, ou partiellement chez les souris DOCA+S. Le facteur anti-hypertrophique ANP¹⁷², également produit sous l'effet de l'étirement mécanique de la paroi du cœur²¹⁰, est augmenté par 5 fois chez les souris DOCA et DOCA+S par rapport aux souris contrôles. Par contre, son expression est diminuée de moitié chez les souris DOCA+T (Figure 11).

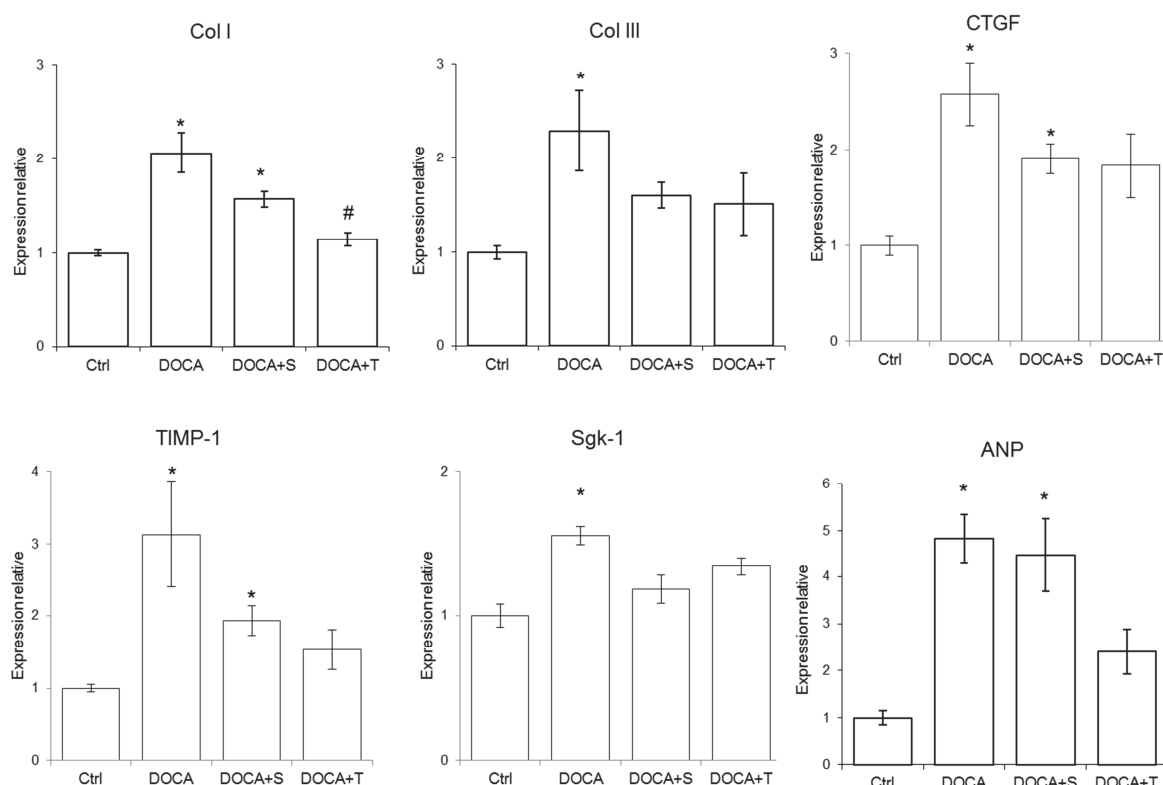


Figure 11. Effet du torasémide sur l'expression cardiaque de gènes impliqués dans le remodelage matriciel. Ctrl : souris contrôles; DOCA : souris uninephrectomisées, traitées à la DOCA et avec de la boisson salée; DOCA+S : souris DOCA traitées avec la spironolactone; DOCA+T : souris DOCA traitées avec le torasémide. * $p < 0,05$ vs Ctrl; # $p < 0,05$ vs DOCA.

3.1.2.5 Le torasémide n'intervient pas dans la modulation de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase

Nous nous sommes intéressés à la modulation de la NADPH oxydase. Ce complexe enzymatique, composé de six sous-unités, catalyse le di-oxygène en espèce réactive de l'oxygène, provoquant ainsi un stress oxydatif dans la cellule. L'expression de ses deux sous-unités transmembranaires (gp91^{phox} ou NOX-2 et p22^{phox}) et d'une de ses unités cytoplasmiques p47^{phox} ont été quantifiées dans le cœur des souris. Les expressions des sous-unités gp91^{phox} et p47^{phox} sont augmentées chez les souris DOCA par rapport aux souris contrôles. Ces augmentations sont prévenues totalement chez les souris DOCA+S, alors que les souris DOCA+T ont un niveau d'expression de ces deux sous-unités proche des souris DOCA (Figure 12). Au contraire, l'expression de la sous-unité p22^{phox} n'est affectée dans aucun des groupes étudiés.

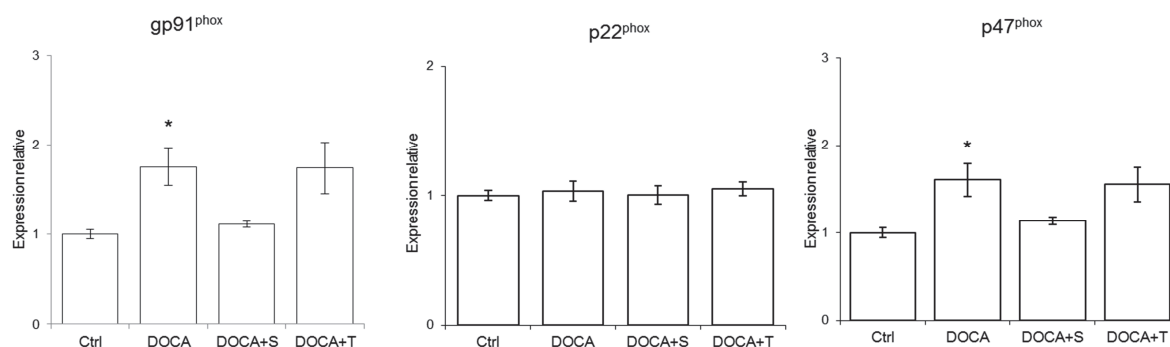


Figure 12. Effet du torasémide sur l'expression cardiaque des sous-unités de la NADPH oxydase. Ctrl : souris contrôles; DOCA : souris uninephrectomisées, traitées à la DOCA et avec de la boisson salée; DOCA+S : souris DOCA traitées avec la spironolactone; DOCA+T : souris DOCA traitées avec le torasémide. * $p < 0,05$ vs Ctrl.

3.1.2.6 Conclusions de l'étude et discussion

Nos résultats obtenus avec le modèle DOCA-Sel chez la souris sont compatibles avec la majorité des études déjà publiées. Si la dose, la durée ou encore le fond génétique peuvent varier, les différentes études rapportent une augmentation de la fibrose cardiaque, de certains marqueurs de l'inflammation et des sous-unités de la NADPH oxydase, avec la DOCA par rapport aux souris contrôles. L'augmentation de l'expression de la sous-unité α du canal épithélial sodique, cible du complexe aldostérone/RM au niveau du néphron distal, valide l'efficacité du modèle DOCA-Sel à activer le RM. Ni la spironolactone, ni le torasémide ne sont capables de bloquer l'augmentation d' α ENaC. On aurait pu s'attendre à ce que la spironolactone, en bloquant le RM, induise une diminution de l'expression de cette sous-unité. Toutefois, il est probable que l'efficacité de la spironolactone dépende des cibles. Dans ces conditions, certaines pourraient ne pas être inhibées par cette dose d'antagoniste du RM, comme α ENaC, alors que d'autres y seraient sensibles comme les sous-unités gp91^{phox} et p47^{phox} de la NADPH oxydase. L'analyse de la modulation des gènes impliqués dans le remodelage et dans le stress oxydatif montre des réponses similaires ou différentielles entre la spironolactone et le torasémide. La spironolactone diminue partiellement l'augmentation de l'expression de Sgk-1, CTGF et des collagènes I et III, connus pour être modulés *via* le RM. Le torasémide a un effet analogue sur la modulation de l'expression de ces gènes. Au contraire, l'ANP montre un profil de modulation très variable selon les groupes. Nos données montrent que la DOCA entraîne une augmentation de l'expression de l'ANP, en réponse à l'augmentation de la pression artérielle, à l'hypertrophie et au remodelage cardiaque induits

par le modèle DOCA-Sel. La dose de spironolactone utilisée ne diminue pas l'expression de l'ANP, contrairement au torasémide. Ce dernier pourrait avoir un effet diurétique plus fort que la spironolactone induisant une baisse plus importante de la pression artérielle, ce qui expliquerait l'absence d'augmentation de la masse cardiaque et la diminution de l'expression de l'ANP. Malheureusement, nous n'avons pas mesuré la pression artérielle des animaux. L'analyse de l'expression de la NADPH oxydase est également un bon exemple du possible effet différentiel entre la spironolactone et le torasémide lors d'un stress minéralocorticoïde. En effet, la modulation du stress oxydatif, représenté ici par les sous-unités gp91^{phox}, p22^{phox} et p47^{phox} de la NADPH oxydase apparaît spécifique de la signalisation du RM car seule la spironolactone peut l'inhiber. Le traitement à la DOCA induit l'augmentation de l'expression de gp91^{phox} et p47^{phox}, mais ne module pas l'expression de p22^{phox}. Ces résultats sont en accord avec des études faites chez la souris soumises au modèle DOCA-Sel où seule l'expression de gp91^{phox} est augmentée¹⁷⁸. Avec l'ajout de spironolactone, l'expression de gp91^{phox} et p47^{phox} est totalement prévenue alors que l'ajout de torasémide n'a aucun effet sur leur expression. Il est à noter le modèle DOCA-Sel chez le rat induit une augmentation de l'expression de la sous-unité p22^{phox}⁵⁸, qui est entièrement prévenue par l'éplérénone dans le cœur.

En conclusion, ces résultats *in vivo* ont permis d'élargir nos connaissances sur les propriétés intrinsèques du torasémide et son incapacité à bloquer le RM. Selon la voie de signalisation considérée, le torasémide et la spironolactone peuvent agir de la même manière ou de manière distincte.

3.2 Approche génétique

A la suite de cette approche pharmacologique, nous nous sommes intéressés aux gènes cibles induits spécifiquement par le RM cardiaque, en utilisant des approches *in vivo* et *in vitro*. Ce chapitre se compose en deux sous-chapitres : les gènes codants et les gènes non-codants. Les gènes codants ont été étudiés à travers deux approches distinctes, l'approche gène candidat en étudiant le gène codant pour CTGF et une approche globale en étudiant le transcriptome cardiaque de souris. L'étude des gènes non-codants s'est focalisée sur les microARNs.

3.2.1 CTGF comme gène candidat de premier choix dans la compréhension de la voie de signalisation du RM cardiaque

3.2.1.1 Etat de la question

Il est maintenant bien documenté que le RM est impliqué dans différentes pathologies cardiaques. Bien qu'il soit exprimé dans tous les types cellulaires du cœur, l'enzyme de sélectivité du ligand 11 β -HSD2 est quant à elle environ 100 fois moins active dans le cardiomyocyte que dans les cellules du néphron distal²⁶. Par conséquent, il semble donc que la liaison de l'aldostérone au RM dans le cardiomyocyte est impossible et que les effets bénéfiques de l'utilisation d'antagonistes du RM, mis en évidence dans les études cliniques comme RALES, EPHESUS et EMPHASIS-HF, résultent plutôt de l'inhibition du complexe glucocorticoïde/RM. Cependant, certains travaux suggèrent que l'aldostérone pourrait se lier au RM dans le cœur et induire l'expression de gènes cibles^{4, 68}. Le débat quant à la nature du ligand activant le RM du cardiomyocyte reste d'actualité.

3.2.1.2 Objectif de l'étude

Le but de notre étude a été de rechercher si l'aldostérone active le RM cardiaque *in vivo*, et plus particulièrement le RM du cardiomyocyte. Pour ce faire, nous avons tiré profit d'une expérience réalisée au laboratoire par un chercheur post-doctorant, le docteur Messaoudi. Celui-ci a traité des souris transgéniques surexprimant spécifiquement le RMh dans les cardiomyocytes et leurs souris contrôles correspondantes avec de l'aldostérone ou de la corticostérone. Après une semaine de traitement, le transcriptome cardiaque global de toutes les souris a été effectué par puces à oligonucléotides, étape à laquelle j'ai participé. En croisant tous les transcriptomes entre eux, nous avons pu montrer que le gène codant pour la protéine CTGF est spécifiquement surexprimé par l'aldostérone et le RM dans le cœur. Ce gène, intervenant dans le remodelage de la matrice extracellulaire, voit son expression augmenter dans le cœur de souris traitées à la DOCA²¹¹ (ce que nous avons confirmé, *confer* chapitre 3.1.2). Le gène codant pour CTGF nous paraît donc être un candidat de premier choix pour comprendre la voie de signalisation du RM dans le cœur et spécifiquement dans le cardiomyocyte. Cette étude a fait l'objet d'une publication en 2013 dont je suis le deuxième auteur, présentée ci-après.

3.2.1.3 Article: Aldosterone-Specific Activation of Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor

In Vivo

Les figures et tableaux supplémentaires n'apparaissant pas dans la version publiée de l'article, ceux-ci ont donc été rajoutés à la suite du PDF. Les tableaux supplémentaires S2 et S3 présentant respectivement la comparaison des transcriptomes des souris contrôles et RM-Cardio non traitées et les résultats des transcriptomes des souris RM-Cardio non traitées et traitées à l'aldostérone, sont mis dans la partie "annexes" en raison de leur grandeur.

Aldosterone-Specific Activation of Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor In Vivo

Smail Messaoudi, Basile Gravez, Antoine Tarjus, Véronique Pelloux, Antoine Ouvrard-Pascaud, Claude Delcayre, Janelise Samuel, Jean-Marie Launay, Catalina Sierra-Ramos, Diego Alvarez de la Rosa, Karine Clément, Nicolette Farman and Frédéric Jaisser

Hypertension. 2013;61:361-367; originally published online January 7, 2013;

doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198986

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2013 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/61/2/361>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/suppl/2013/01/07/HYPERTENSIONAHA.112.198986.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Hypertension* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Hypertension* is online at:

<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Aldosterone-Specific Activation of Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor In Vivo

Smail Messaoudi, Basile Gravez, Antoine Tarjus, Véronique Pelloux, Antoine Ouvrard-Pascaud, Claude Delcayre, Janelise Samuel, Jean-Marie Launay, Catalina Sierra-Ramos, Diego Alvarez de la Rosa, Karine Clément, Nicolette Farman, Frédéric Jaisser

Abstract—Inappropriate mineralocorticoid receptor (MR) activation is involved in cardiac diseases. Whether and how aldosterone is involved in the deleterious effects of cardiac mineralocorticoid activation is still unclear. Mice overexpressing MR in cardiomyocytes and their controls were treated for 7 days with aldosterone, and cardiac transcriptome was analyzed. Aldosterone regulated 265 genes in cardiomyocyte-targeted MR overexpression mice. Forty three of these genes were also differentially expressed between untreated cardiomyocyte-targeted MR overexpression and controls mice, thus representing putative aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes. Among these genes, we focused on connective tissue growth factor (CTGF). In vivo, in cardiomyocyte-targeted MR overexpression mice, aldosterone (but not corticosterone) induced CTGF expression (mRNA and protein) in cardiomyocytes. Ex vivo, aldosterone induced the binding of mineralocorticoid receptor to CTGF promoter and increased the expression of its transcript. Aldosterone induction of CTGF synthesis in cardiomyocytes seems pathologically relevant as the increase in CTGF observed in a model of heart failure (transverse aortic constriction) in rats was prevented by eplerenone, a mineralocorticoid receptor blocker. This study demonstrates that aldosterone specifically regulates gene expression in cardiomyocytes despite large prevalence of glucocorticoids in plasma. (*Hypertension*. 2013;61:361-367.) • [Online Data Supplement](#)

Key Words: aldosterone ■ mineralocorticoid receptor ■ gene microarray ■ connective tissue growth factor

Mineralocorticoid receptor (MR; a ligand-dependent transcription factor) cardiac expression is increased in hypertension,¹ myocardial infarction,² and diastolic heart failure.³ MR antagonism reduces morbidity and mortality in patients with heart failure.⁴⁻⁶ Experimentally, MR antagonism limits the transition to heart failure in models of systolic left ventricular dysfunction,⁷ myocardial infarction,⁸ and diastolic dysfunction.^{3,9}

Although MR is expressed in all cardiac cell types,¹⁰ cardiomyocyte-MR seemed to play a decisive role in experimental models of cardiac diseases: in mice, genetic cardiomyocyte-MR inactivation improves ventricular function and remodeling in ischemic heart failure,¹¹ whereas cardiomyocyte-MR overexpression induces arrhythmias,¹² worsens angiotensin II-induced cardiac remodeling,⁹ and alters coronary function.¹³

MR binds aldosterone and glucocorticoids with an equal affinity.¹⁴ The MR selectivity for aldosterone is achieved by the coexpression of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2), which inactivates glucocorticoids.¹⁵ Because 11 β -HSD2 activity is low in cardiomyocytes,¹⁶

the beneficial effects of MR blockade in clinical studies may result from inhibition of glucocorticoids binding to the MR. However, several studies suggest that aldosterone may also activate cardiomyocyte MR: chronic infusion of aldosterone induces arrhythmia, alters cardiomyocyte calcium current, and impairs the activity of the ryanodine receptor.^{12,17} In association with salt and uninephrectomy, aldosterone induces cardiac oxidative stress, inflammation, and fibrosis.¹⁸ Despite this evidence, the question of the nature of the ligand(s) activating the MR in cardiomyocytes remains the subject of debate.

The aim of this study was to question whether aldosterone could activate cardiomyocyte-MR in vivo. To answer this question, mice with cardiomyocyte-targeted MR overexpression (MR-Cardio mice) and their controls were treated with a low dose of aldosterone for a short period (1 week) to favor the identification of primary aldosterone targets (rather than those involved in compensatory/adaptive processes occurring after chronic administration of aldosterone). We report that a moderate increase in plasma aldosterone concentration can activate MR in cardiomyocytes

Received May 22, 2012; first decision June 11, 2012; revision accepted September 14, 2012.

From Inserm U872, Team 1, Pierre and Marie Curie University, Paris, France (S.M., B.G., A.T., N.F., F.J.); Inserm U872, Team 7, Pierre and Marie Curie University, Paris, France (V.P., K.C.); UMR 644 Inserm-Université de Rouen, Rouen, France (A.O.-P.); Inserm U942, Paris, France (C.D., J.S., J.-M.L.); University of La Laguna, Tenerife, Spain (C.S.-R., D.A.d.I.R.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198986/-/DC1>

Correspondence to Frédéric Jaisser, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe 1, Escalier E, 1^{er} étage, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France. E-mail frederic.jaisser@crc.jussieu.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198986

despite a large excess of endogenous glucocorticoids. In particular, we demonstrate that connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by aldosterone in cardiomyocytes *ex vivo* and *in vivo*.

Materials and Methods

Methods are provided in online-only Data Supplement in the Methods section.

Results

Aldosterone Treatment

Aldosterone administration (1 week, 60 µg/kg per day) did not alter body, heart, and kidney weight (Table). Treatment did not alter MR expression in controls (Ctrl) and MR-Cardio mice (Figure S1, available in the online-only Data Supplement). Aldosterone treatment increased aldosteronemia similarly in Ctrl and MR-Cardio mice (4- to 5-fold; $P<0.001$; Table). Corticosteronemia was decreased in treated Ctrl mice but not in MR-Cardio mice (Table). Renal expression of known aldosterone target genes was similarly increased in Ctrl and MR-cardio mice treated with aldosterone (α subunit of the amiloride-sensitive sodium channel and serum/glucocorticoid regulated kinase 1; +25% and +40%, respectively; $P<0.05$) attesting for the efficiency of the treatment (Figure S2).

Specific MR-Dependent Response to Aldosterone

To identify potential genes dependent on activation of MR by aldosterone in cardiomyocytes, we hypothesized that these genes should be dependent on MR expression (ie, genes that are differentially expressed in the absence of aldosterone treatment in MR-Cardio compared with Ctrl mice) and aldosterone administration should amplify the regulation of their expression in MR-Cardio mice.

We recently demonstrated that neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) is a direct target of aldosterone in the heart.¹⁹ To test whether our approach allows the identification of aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes, we first studied how aldosterone administration affects cardiac Ngal expression in Ctrl and MR-Cardio mice. As we previously described,¹⁹ Ngal expression (mRNA and protein) was upregulated in MR-Cardio mice when compared with Ctrl mice. Aldosterone further enhanced cardiac Ngal expression in MR-cardio mice (Figure 1). In Ctrl mice, as previously published, Ngal was not regulated by aldosterone at the low dose used.¹⁹ Thus, our strategy seems valuable to highlight genes dependent on MR activation by aldosterone in cardiomyocytes.

Identification of Aldosterone-Regulated Genes in Cardiomyocytes

We then adopted a transcriptomic approach to identify genes dependent on aldosterone activation of MR in cardiomyocytes. To identify the cardiomyocyte-MR sensitive genes, we analyzed the cardiac transcriptome of MR-Cardio mice compared with Ctrl mice (Figure 2). We found 865 genes differentially regulated between Ctrl and MR-Cardio mice (Table S2), 447 upregulated genes and 418 downregulated genes. Among these genes, the quantification of genes predicted to be strongly regulated by MR (*Kcnk1*: potassium channel, subfamily K, member 1; and *Tnnt3*: Troponin T3) was in accordance with microarray predictions (Figure S3A and S3B).

Then, we performed a comparative analysis of cardiac transcriptome of aldosterone-treated MR-Cardio mice and untreated MR-Cardio mice (Figure 2). Aldosterone regulated 265 genes in MR-Cardio mice (165 upregulated genes and 100 downregulated genes; Table S3). Among these genes, the quantification of genes predicted to be strongly regulated by aldosterone in MR-Cardio mice (*Adamts4*: a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, member 4; and *Trpc4*: transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4) was in accordance with microarray predictions (Figure S3C and S3D).

Finally, we crossed the list of the genes regulated in MR-Cardio mice with that of aldosterone-regulated genes and identified 43 (23 up- and 20 downregulated) potential aldosterone/MR targets in cardiomyocytes (Figure S4). Several classes of proteins were represented including secreted growth factors (CTGF and Hgf [hepatocyte growth factor]), ion channels (*Kcnmb4*: potassium large conductance Ca^{2+} -activated channel, subfamily M, β member 4; *Kcnv2*: potassium channel, subfamily V, member 2; and *Cacna1s*: Ca^{2+} channel, voltage-dependent, L-type, α 1S subunit) or cell adhesion molecules (*Cdh4*—Cadherin 4-, and *Itgb6*—integrin β 6).

CTGF Is Regulated by Aldosterone in Cardiomyocytes *In Vivo*

To assess whether our strategy can identify aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes, we selected CTGF, a growth factor involved in aldosterone/salt-mediated cardiac fibrosis.²⁰ In Ctrl mice, cardiac CTGF expression was not altered by aldosterone at the low dose used (Figure 3) but a higher dose (200 µg/kg per day instead of 60 µg/kg per

Table. General Characteristics

Parameters	Controls		Mineralocorticoid Receptor in Cardiomyocytes	
	Untreated	Aldosterone	Untreated	Aldosterone
Body weight, g	27.5±0.9	29.2±0.8	28.7±0.8	30.1±0.5
Heart weight, mg	149.0±9.2	141.9±4.6	151.1±4.4	165.6±7.7
Kidney weight, mg	411.3±17.4	432.0±11.0	420.7±18.7	396.5±16.2
Aldosterone, nmol/L	0.6±0.1	2.9±0.1*	0.7±0.1	2.8±0.1*
Corticosterone, nmol/L	261.4±53.6	137.8±12.4*	226.0±31.2	152.0±33.0

* $P<0.05$ vs corresponding untreated mice.

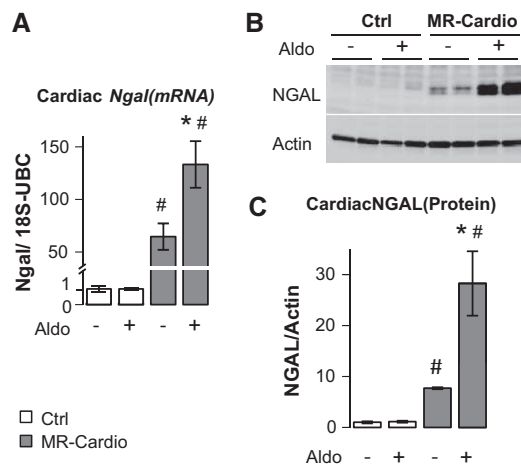


Figure 1. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) regulation by aldosterone (aldo) in the heart. **A** through **C**, Cardiac Ngal mRNA (**A**) and protein (**B** and **C**) expression was increased by aldosterone (aldo) in mineralocorticoid receptor (MR)-cardio mice only. Mean±SEM (n=6–9 mice per condition). **P*<0.05 vs corresponding untreated mice; #*P*<0.05 vs corresponding controls (Ctrl).

day) increased CTGF expression in cardiomyocytes (Figure S6). CTGF mRNA and protein expression was increased in untreated MR-Cardio mice compared with Ctrl mice, and further increased by aldosterone (Figure 3A through 3C). Double immunostaining of cardiac sections with CTGF and vinculin showed that CTGF was produced by cardiomyocytes in treated and untreated MR-Cardio mice (Figure 3D). Cardiac fibrosis was however not increased in our aldosterone administration protocol (Figure S5).

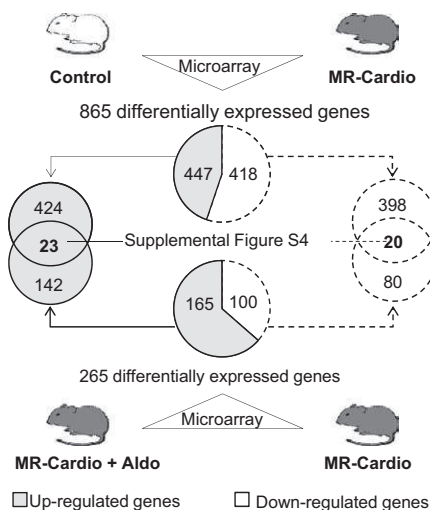


Figure 2. Strategy to identify aldosterone (aldo)-regulated genes in cardiomyocytes. First, we determined by microarray the genes differentially expressed in the absence of treatment in mineralocorticoid receptor (MR)-Cardio compared with controls (Ctrl) mice (**upper** part of the figure). Then, we identified by microarray the genes regulated by aldosterone in MR-cardio mice (**lower** part of the figure). Finally, we crossed the list of upregulated genes in MR-Cardio mice in the absence of treatment with those of aldosterone upregulated genes in MR-Cardio mice (**left** part of the figure). We adopted the same approach with downregulated genes (**right** part of the figure).

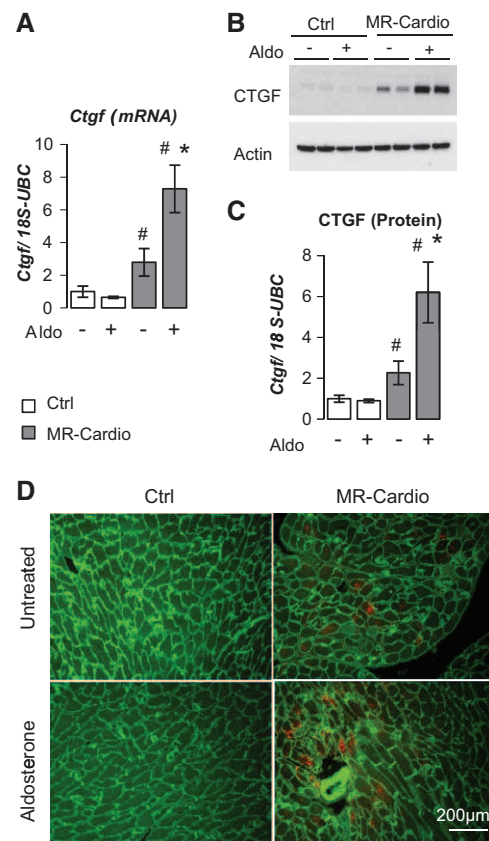


Figure 3. Ctgf is regulated by aldosterone in cardiomyocytes. **A** through **C**, Cardiac Ctgf mRNA (**A**) and protein (**B** and **C**) expression were increased by aldosterone (Aldo) in mineralocorticoid receptor (MR)-cardio mice only. Mean±SEM (n=6–9 mice per condition). **P*<0.05 vs corresponding untreated mice; #*P*<0.05 vs corresponding controls (Ctrl). **D**, Double immunolabeling of cardiac sections with vinculin (green) and Ctgf (red). Ctgf was localized in cardiomyocytes of MR-Cardio mice (treated or not with aldosterone).

Aldosterone regulation of CTGF expression was further examined ex vivo in the cardiomyocyte cell line H9C2-MR+. Aldosterone induced a dose-dependent increase in CTGF expression that was MR dependent, as spironolactone abolished aldosterone effect (Figure 4A and 4B). Altogether these results strongly suggest that CTGF is a target of aldosterone-MR complexes in cardiomyocytes.

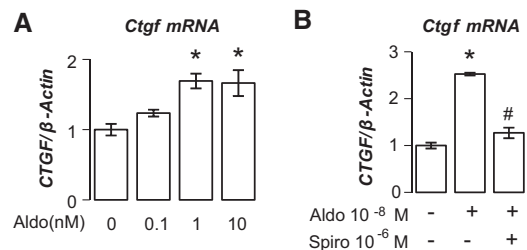


Figure 4. Regulation of Ctgf by aldosterone (aldo) ex vivo. **A**, Aldosterone induced an increase of Ctgf mRNA in H9C2-mineralocorticoid receptor (MR+) cells at the dose of 10⁻⁸M. Mean±SEM (n=6 per condition). **P*<0.05 vs untreated. **B**, Spironolactone blocked aldosterone-induced Ctgf mRNA increase in H9C2-MR+ cells. Mean±SEM (n=6 per condition). **P*<0.05 vs controls (Ctrl); #*P*<0.05 vs aldo treated cells.

CTGF Is Not Regulated by Corticosterone in Cardiomyocytes

To test whether CTGF was regulated in cardiomyocytes specifically by aldosterone or whether its expression was related to MR activation regardless of the ligand, we treated Ctrl and MR-Cardio mice with corticosterone for 1 week. Corticosterone administration did not alter body, heart, and kidney weight (Table S4). Corticosterone treatment similarly increased corticosteronemia (2- to 3-fold; $P<0.05$; Table S4) and hepatic expression of *Sult1d1* (a glucocorticoid regulated gene)²¹ in Ctrl and MR-cardio mice ($P<0.05$; Figure S7). Corticosterone also altered cardiac expression of *Adams4* and *Trpc4* in MR-Cardio mice (Figure S8). However, cardiac expression of CTGF (mRNA and protein) was not affected by corticosterone (Figure 5). This result shows that MR regulation of CTGF expression in cardiomyocytes was dependent on aldosterone, not on glucocorticoids.

CTGF Is a Direct Target of MR

To test whether CTGF is a direct target of MR we performed a chromato-immunoprecipitation experiment. First, we cotransfected COS-7 cells with MR and a fragment of the *CTGF* gene (−671/+284, relative to the transcription start site) fused to luciferase (Figure 6A). Of note, this fragment does not contain any canonical hormone response elements. Aldosterone increased luciferase activity in an MR-dependent manner, as spironolactone abolished aldosterone effect (Figure 6B). Transfections using an empty vector and MR, or the *CTGF* promoter fragment in the absence of MR did not alter luciferase activity on aldosterone treatment (data not shown). We then performed chromato-immunoprecipitation analysis in COS-7 cells cotransfected with *CTGF* promoter fragment and MR. MR binding was evaluated using 4 different primer sets (Figure 6A). Aldosterone induced MR enrichment (≤ 10 -fold) in the area of the *CTGF* promoter covered by primer pair P3 (≈ 100 bp upstream of the transcription start site of the *CTGF* promoter; Figure 6C), indicating increased binding of MR to *CTGF* promoter when aldosterone activates the receptor.

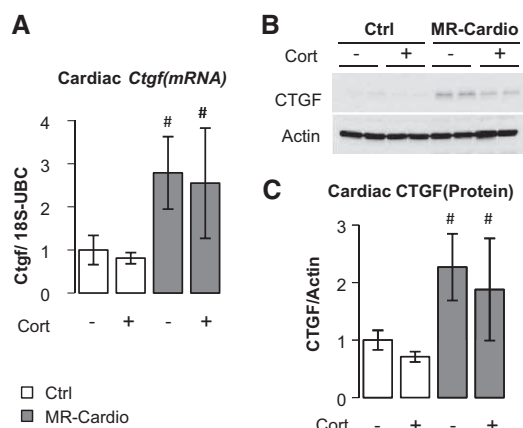


Figure 5. *Ctgf* regulation by corticosterone in the heart. **A** through **C**, Cardiac *Ctgf* mRNA (**A**) and protein (**B** and **C**) expression were not altered by corticosterone (Cort) in both controls (Ctrl) and mineralocorticoid receptor (MR)-cardio mice. Mean \pm SEM (n=6–7). # $P<0.05$ vs corresponding Ctrl.

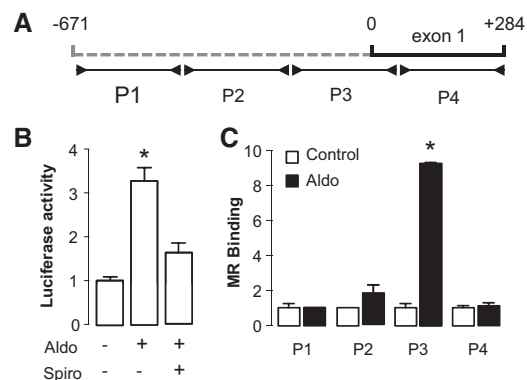


Figure 6. *Ctgf* is a direct target of mineralocorticoid receptor (MR). **A**, Schematic representation of mouse *Ctgf* genomic fragment used for construct. **Arrowheads** indicate the approximate location of primers used to analyze chromato-immunoprecipitation (ChIP) products. **B**, Luciferase activity mediated by mouse (−671/+284) *Ctgf* gene fragment in COS-7 cells. Aldosterone increased luciferase activity, an effect blocked by spironolactone. Mean \pm SEM (n=11 per condition). * $P<0.05$ vs control. **C**, Quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis of MR binding to the (−671/+284) *Ctgf* gene fragment. Aldosterone induced MR enrichment in the area of the *Ctgf* promoter covered by primer pair P3. **Bars** represent the average fold enrichment of each PCR fragment over the value obtained with the irrelevant IgG. Mean \pm SEM (n=3 per condition). * $P<0.05$ vs control.

Cardiomyocytes CTGF Production in Heart Failure

To study whether aldosterone/MR may play a role in cardiac pathologies by promoting cardiomyocyte CTGF production, we used a model of heart failure in rat (thoracic aortic constriction). Thoracic aortic constriction induced cardiac hypertrophy (+125%, $P<0.001$), which was partially prevented by eplerenone, a specific MR blocker ($P<0.05$; Figure S9). Thoracic aortic constriction induced an increase in CTGF expression in cardiomyocytes, which was prevented by eplerenone (Figure 7A and 7B). Therefore in this model, MR activation participates to CTGF increase in cardiomyocytes.

Discussion

In this study, we have associated transgenic, pharmacological, and genomic approaches to demonstrate that increased

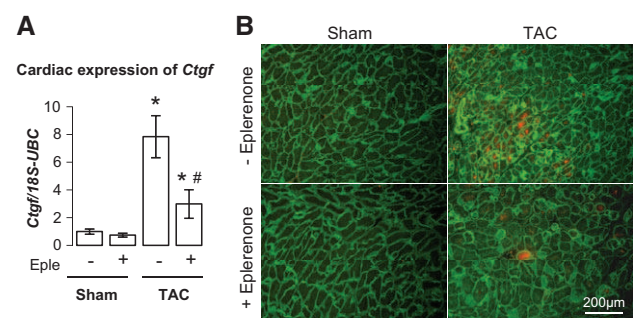


Figure 7. *Ctgf* increase in a model of heart failure. **A**, The cardiac expression of *Ctgf* mRNA was increased by thoracic aortic constriction (TAC) and partially normalized by eplerenone (eple). **B**, Double immunolabeling of cardiac sections with vinculin (green) and *Ctgf* (red). *Ctgf* was expressed in the cardiomyocytes of rats with TAC \pm eplerenone. Mean \pm SEM (n=4–6). * $P<0.05$ vs sham, # $P<0.05$ vs TAC-eple.

plasma aldosterone concentration can activate cardiomyocyte MR and regulate specific genes despite the large excess of endogenous glucocorticoids.

Our model of MR overexpression, although artificial, mimics a situation common to several cardiac diseases where cardiac MR expression is enhanced.^{1–3} In these studies, the cardiac increase in MR expression is ≈ 2 -fold, but can reach 12-fold in models of hypertension¹ (malignant SHR stroke-prone rats). The cardiac MR level in MR-Cardio mice is therefore high, albeit equivalent to that observed in the malignant SHR-stroke-prone rats. However, the MR-Cardio mouse model allowed for obtaining results that are clinically relevant. Indeed, this model highlighted the role of MR in electrophysiological remodeling, and subsequent posterior studies in nontransgenic models such as rats and rabbits confirmed these findings.^{22,23} Most importantly, MR-Cardio mice allowed us to demonstrate that MR triggers cardiac arrhythmias and particularly promotes ventricular premature complexes,¹² suggesting that MR blockers may be effective in the treatment of arrhythmias. This was recently confirmed by a meta-analysis showing that MR blockers reduced episodes of ventricular premature complexes and ventricular tachycardia in humans.²⁴

It is often argued that circulating concentration of glucocorticoids (100- to 1000-fold higher than those of aldosterone) preclude MR occupancy by aldosterone in nonprotected tissues and cell types such as cardiomyocytes. However, we identified putative targets of aldosterone in cardiomyocytes, and we demonstrated that 1 of them, CTGF, was actually regulated by aldosterone via MR in cardiomyocytes in vivo. Importantly, this result was obtained with aldosterone alone (at a dose that does not increase blood pressure) and not in a context of salt loading. Therefore, even in cells with low 11 β -HSD2 such as cardiomyocytes, aldosterone can activate MR, at least in some situations. In classical targets of aldosterone such as the distal nephron, 11 β -HSD2 cannot inactivate all glucocorticoids present in the cell.²⁵ Therefore, there must be other mechanisms that contribute to selective MR activation by aldosterone in classic targets and probably also in nonepithelial tissues. Ligand-sensitive transactivation efficacy could be one of such mechanisms. Indeed, although mineralocorticoids and glucocorticoids bind MRs with equivalent affinity, it has been demonstrated in vitro that the aldosterone/MR complex is more stable and is 200-fold more efficient for transactivation than the glucocorticoid/MR complex.²⁶ Subcellular compartmentalization or posttranslational modifications of MRs or both could also be mechanisms that vary MR occupancy by aldosterone or glucocorticoids. Pathological situations could also alter these mechanisms.

We report here that increased expression of cardiomyocyte-MR (without change in aldosterone concentration) altered the expression of 865 genes. This suggests that the level of cardiac MR expression (threshold effect) plays a crucial role in MR signaling. Enhanced MR signaling may occur in the presence of normal circulating aldosterone concentration, because of increased local expression of MR. This could explain why MR blockade is so efficient in cardiac diseases despite low to normal levels of aldosterone.^{4,5} Moreover, a recent study demonstrates that the highest tertile

of aldosterone in patients with systolic heart failure (with no differences in median aldosterone concentration between patients with systolic heart failure and those without systolic heart failure) is associated with an adverse outcome.²⁷ The control of aldosterone plasma concentration (through the development and the use of aldosterone-synthase inhibitors such as the FAD286,²⁸ which experimentally presents promising results in treatment of cardiac heart failure) in addition to MR blockers may thus be a complementary strategy to fully block the aldosterone/MR activated pathways in patients with elevated aldosteronemia.

Corticosterone also regulated the expression of genes in MR-Cardio mice (*Adamts4* and *Trpc4*). We cannot exclude that these genes were regulated by the stimulation of the glucocorticoid receptor. Interestingly, these genes were also regulated by aldosterone. This shows a high level of complexity in the regulation of MR activation, suggesting that MR may regulate differentially the same target according to the nature of the ligand (eg, *Adamts4*) and that MR can regulate the same target regardless the ligand (eg, *Trpc4*). Interestingly, the expression of only few MR-regulated genes in MR-Cardio mice was further enhanced by aldosterone administration. It can be hypothesized that most genes in MR-Cardio mice may be regulated by endogenous glucocorticoids occupying MR. A second possibility is that most of the MR-regulated genes in MR-Cardio mice reached a threshold that cannot be further enhanced. Another possibility is that these genes were not primary targets of MR but rather genes regulated subsequently to the induction of processes after chronic MR activation. These genes should be the subjects of further studies, allowing a better understanding of MR action and regulation of genes in the heart.

CTGF expression is increased in various heart diseases.²⁹ Our results suggest that this increase may be induced (at least partly) by aldosterone. It has been demonstrated that aldosterone regulates CTGF expression *ex vivo* in various cell types (fibroblasts,²⁰ smooth muscle cells,³⁰ and renal mesangial cells)³¹ including cardiomyocytes.³² However, we show here for the first time that CTGF is a direct target of MR, and that aldosterone (but not corticosterone) increases CTGF expression in cardiomyocytes through the stimulation of cardiomyocyte-MR in vivo. Mineralocorticoids can also induce CTGF through other pathways, in the heart, in a serum/glucocorticoid regulated kinase 1-dependent manner²⁰ and in the vasculature, in an oxidative stress-dependent manner.³⁰ This does not mean that these pathways are mutually exclusive, and convergent signaling may be involved.

Interestingly, although CTGF was increased by aldosterone in MR-Cardio mice, cardiac fibrosis was not further enhanced. Along the same line, transgenic overexpression of CTGF in kidney, liver, and heart did not induce fibrosis.³³ CTGF is thus considered to induce an environment favoring fibrogenic stimuli rather than promoting fibrosis by itself.³³ Therefore, aldosterone may promote fibrosis through the induction of such molecules that create an environment favoring fibrogenic stimuli. This may explain why aldosterone alone is not fibrogenic but requires triggers such as enhanced sodium intake to induce cardiac fibrosis linked to MR activation.³⁴

Conclusions

This study identified genes modulated by aldosterone/MR in cardiomyocytes despite the absence of 11 β -HSD2. We demonstrated that CTGF was regulated by aldosterone and MR in cardiomyocytes. These findings open new perspectives in the understanding of the role played by aldosterone and cardiomyocyte-MR in cardiac physiology and pathology. In particular, they raise the question of MR selectivity mechanisms other than the 11- β HSD2 and suggest that the control of aldosterone plasma concentration and the use of aldosterone-synthase inhibitors in addition to MR blockade may be beneficial in cardiac diseases.

Acknowledgments

We thank Dr Aniko Naray-Fejes-Toth for providing the H9C2-MR+ cells and Evelyn Polidano and Régine Merval for animal surgery.

Sources of Funding

This work was supported by Institut National pour la Santé et Recherche Médicale, and grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR005-PCOD005 and ANR09-BLAN-0156-01), the Centre de Recherche Industrielle et Technique and the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain; BFU2010-16265 and Consolider SICI-CSD2008-000005 to Dr de la Rosa). Dr Messaoudi received fellowships from the Region île de France (CODDIM) and the French society for hypertension (SFHTA).

Disclosures

None.

References

- Konishi A, Tazawa C, Miki Y, Darnel AD, Suzuki T, Ohta Y, Suzuki T, Tabayashi K, Sasano H. The possible roles of mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;85:439–442.
- Milik E, Szczepańska-Sadowska E, Małkiński W, Cudnoch-Jedrzejewska A. Enhanced expression of mineralocorticoid receptors in the heart after the myocardial infarct in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58:745–755.
- Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishio M, Takeda Y, Yoshida J, Miwa T, Okamoto M, Masuyama T, Nonaka Y, Hori M. Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R946–R954.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341:709–717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gattlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309–1321.
- Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B; EMPHASIS-HF Study Group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011;364:11–21.
- Kuster GM, Kotlyar E, Rude MK, Siwik DA, Liao R, Colucci WS, Sam F. Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation*. 2005;111:420–427.
- Wang D, Liu YH, Yang XP, Rhaleb NE, Xu J, Peterson E, Rudolph AE, Carretero OA. Role of a selective aldosterone blocker in mice with chronic heart failure. *J Card Fail*. 2004;10:67–73.
- Di Zhang A, Nguyen Dinh Cat A, Soukaseum C, Escoubet B, Cherfa A, Messaoudi S, Delcayre C, Samuel JL, Jaisser F. Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension*. 2008;52:1060–1067.
- Messaoudi S, Jaisser F. Aldosterone and the mineralocorticoid receptor. *Eur Heart J Suppl*. 2011;13:B4–B9.
- Fraccarollo D, Berger S, Galuppo P, Kneitz S, Hein L, Schütz G, Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2011;123:400–408.
- Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Bénitah JP, et al. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2005;111:3025–3033.
- Favre J, Gao J, Zhang AD, Remy-Jouet I, Ouvrard-Pascaud A, Dautreux B, Escoubet B, Thuillez C, Jaisser F, Richard V. Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H2035–H2043.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 1987;237:268–275.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*. 1988;242:583–585.
- Lombès M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*. 1995;92:175–182.
- Gómez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, et al. Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins. *Circulation*. 2009;119:2179–2187.
- Marney AM, Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci*. 2007;113:267–278.
- Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, Nguyen Dinh Cat A, Hernandez-Diaz I, Alvarez de la Rosa D, Perret C, López Andrés N, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaisser F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension*. 2012;59:966–972.
- Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, et al. SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *J Mol Med*. 2006;84:396–404.
- Wong S, Tan K, Carey KT, Fukushima A, Tiganis T, Cole TJ. Glucocorticoids stimulate hepatic and renal catecholamine inactivation by direct rapid induction of the dopamine sulfotransferase Sult1d1. *Endocrinology*. 2010;151:185–194.
- Laszlo R, Bentz K, Konior A, Eick C, Schreiner B, Kettering K, Schrieck J. Effects of selective mineralocorticoid receptor antagonism on atrial ion currents and early ionic tachycardia-induced electrical remodeling in rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2010;382:347–356.
- Dartsch T, Fischer R, Gapelyuk A, Weiergraber M, Ladage D, Schneider T, Schirdewan A, Reuter H, Mueller-Ehmsen J, Zobel C. Aldosterone induces electrical remodeling independent of hypertension. *Int J Cardiol*. Epub ahead of print July 14, 2011.
- Wei J, Ni J, Huang D, Chen M, Yan S, Peng Y. The effect of aldosterone antagonists for ventricular arrhythmia: a meta-analysis. *Clin Cardiol*. 2010;33:572–577.
- Funder JW. Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor. *Hypertension*. 2009;53:286–290.
- Farman N, Rafestini-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F181–F192.
- Güder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Alolio B, Ertl G, Angermann CE, Störk S. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation*. 2007;115:1754–1761.
- Mulder P, Mellin V, Favre J, Vercauteren M, Remy-Jouet I, Monteil C, Richard V, Renet S, Henry JP, Jeng AY, Webb RL, Thuillez C. Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *Eur Heart J*. 2008;29:2171–2179.
- Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;195:321–338.
- Newfell BG, Iyer LK, Mohammad NN, McGraw AP, Ehsan A, Rosano G, Huang PL, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1871–1880.
- Gauer S, Segitz V, Goppelt-Strube M. Aldosterone induces CTGF in mesangial cells by activation of the glucocorticoid receptor. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:3154–3159.

32. Lee YS, Kim JA, Kim KL, Jang HS, Kim JM, Lee JY, Shin IS, Lee JS, Suh W, Choi JH, Jeon ES, Byun J, Kim DK. Aldosterone upregulates connective tissue growth factor gene expression via p38 MAPK pathway and mineralocorticoid receptor in ventricular myocytes. *J Korean Med Sci.* 2004;19:805–811.
33. Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals. *J Cell Commun Signal.* 2010;4:1–4.
34. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med.* 1992;120:893–901.

Novelty and Significance

What Is New?

- Aldosterone regulates gene expression in cardiomyocytes in vivo despite high plasma glucocorticoid concentration and independently of salt loading.

What Is Relevant?

- There must be selectivity mechanisms other than the 11- β HSD2 in cardiomyocytes. Control of aldosterone plasma concentration in addition to MR blockade is a strategy to consider.

Summary

Aldosterone regulates gene expression in cardiomyocytes in vivo.

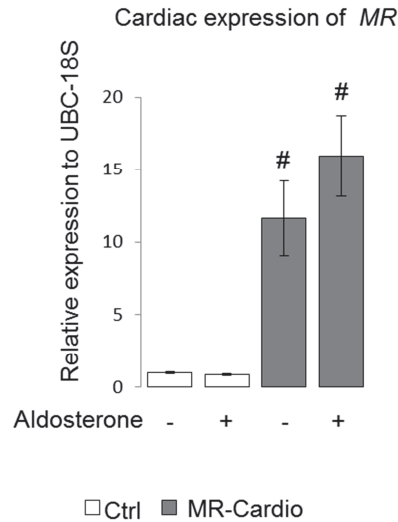
Genes	Forward	Reward
18S	CgC CgC Tag Agg TgA AAT TC	TCT Tgg CAA ATg CTT TCg C
Adamts4	Tgg ggA ggg CAT CAg CgT gTA T	AgC AAg CAg TCg ggC TCC TTC A
α ENaC	Cgg AgT TgC TAA ACT CAA CAT C	Tgg AgA CCA gTA CCg gCT
Ctgf	TgA CCC CTg CgA CCC ACA	TAC ACC gAC CCA CCg AAg ACA CAg
Kcnk1	ATT ggg ACT TCA CCT Cgg CgC T	TgA CAT gCA Cgg TgA CAC gCT
MR	ggC TAC CAC AgT CTC CCT gA	CgT TgA CAA TCT CCA TgT
Sgk1	ACg gAC CCA ggT TgA TTT gTT	Agg gCA gTT TTg gAA Agg TT
Sult1d1	ATg TCA TCA ggC Cgg gCT TCA	ACg TTg TgA gCT ACC CAg ggA C
Tnnt3	gAA AAA ggC TCT gTC CTC CA	CAG AgT TCC TTg gCC TTg TC
Trpc4	gAC CTg TCg ATg TgC TgA gA	gCT ggA ggA gAA gAC ACT gg
Ubc	AgC CCA gTg TTA CCA CCA Ag	ACC CAA gAA CAA gCA CAA gg

Supplemental table S1 : Primers sequence. **Adamts4** : *A disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4*; **α ENaC** : *sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha*; **Ctgf** : *Connective tissue growth factor*; **Kcnk1** : *potassium channel, subfamily K, member 1*; **MR** : *mineralocorticoid receptor*; **Sgk1** : *Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*; **Sult1d1** : *sulfotransferase family 1D, member 1*; **Tnnt3** : *troponin T3*; **Trpc4** : *transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4*; **Ubc** : *Ubiquitin C*.

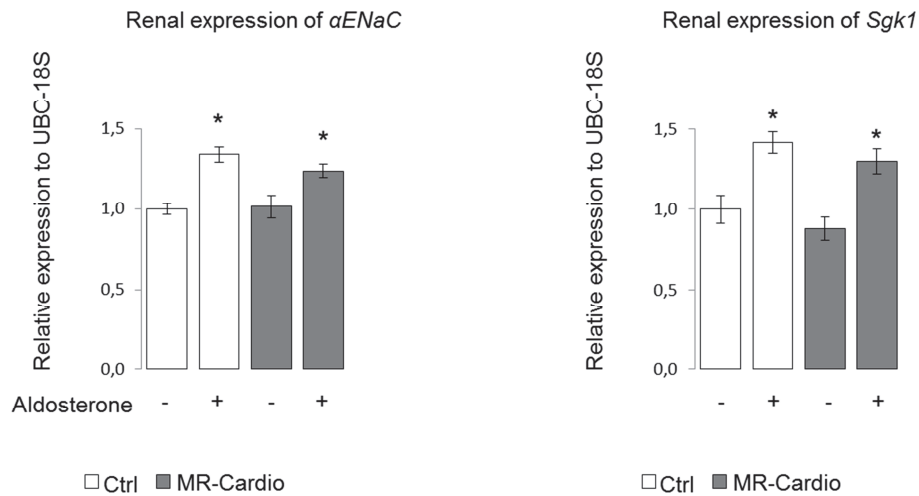
	Ctrl		MR-Cardio	
	Untreated	Corticosterone	Untreated	Corticosterone
Body weight (g)	27.5 \pm 0.9	28.8 \pm 1.0	28.7 \pm 0.8	30.3 \pm 1.8
Heart weight (mg)	149.0 \pm 9.2	138.3 \pm 3.7	151.1 \pm 4.4	158.0 \pm 7.5
Kidney weight (mg)	411.3 \pm 17.4	397.4 \pm 10.7	420.7 \pm 18.7	392.0 \pm 20.9
Corticosterone (nM)	0.6 \pm 0.1	453.4 \pm 76.4 *	0.7 \pm 0.1	352.8 \pm 36 *

Supplemental table S4 : General characteristics of Corticosterone-treated and non-treated mice.

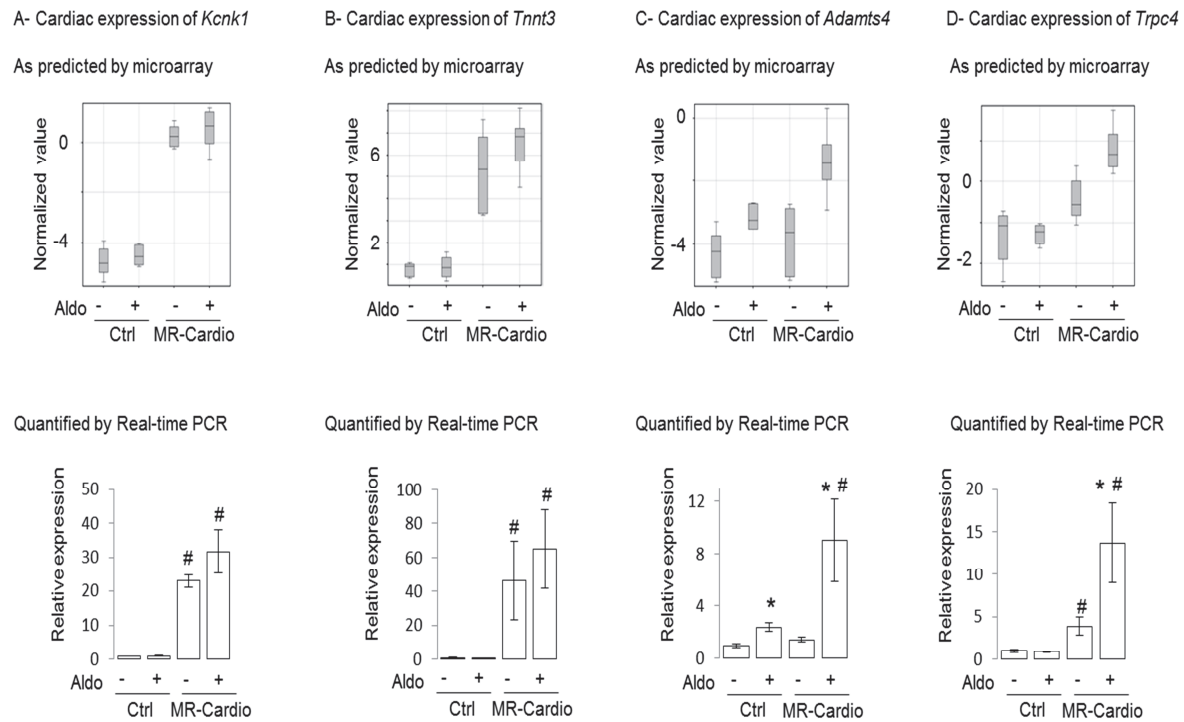
* $p < 0.05$ vs corresponding untreated mice.



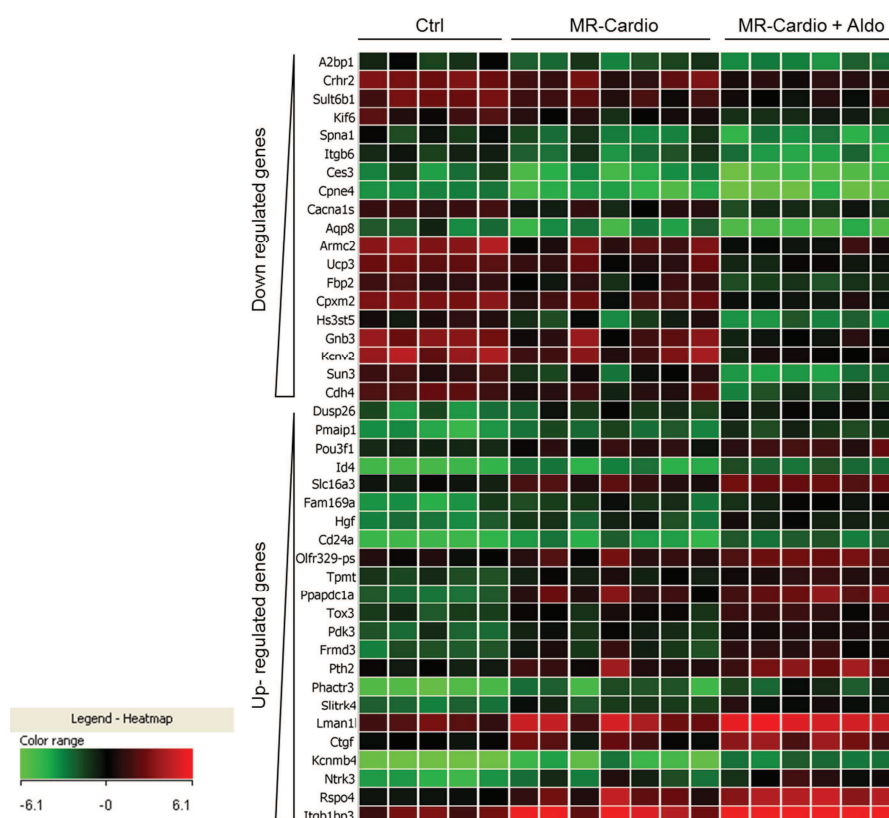
Supplemental figure S1 : Cardiac MR expression (mRNA) assessed by Q-PCR. Cardiac MR expression was increased in MR-cardio mice only (treated and untreated). Aldosterone treatment did not alter cardiac MR expression. Mean±SEM (n=6 to 9 mice per condition). [#] $p<0.05$ vs corresponding Ctrl.



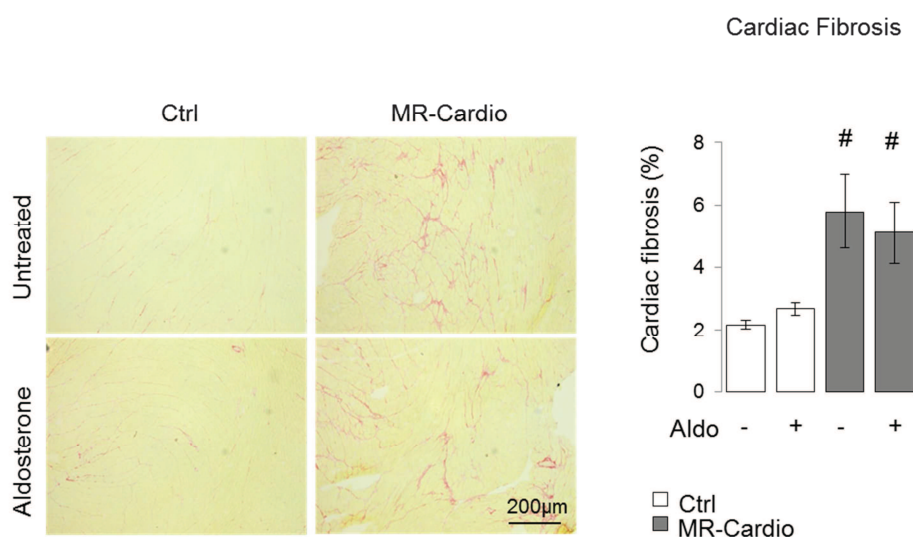
Supplemental figure S2 : In both Ctrl and MR-cardio mice *αENaC* and *Sgk1* renal expression was increased specifically by aldosterone. The expression of these genes was assessed by quantitative real-time PCR. Statistical analysis was performed by 2-way anova test followed by the Holm posthoc test to adjust for multiple comparisons. Mean±SEM (n=6 to 9). ^{*} $p<0.05$ vs corresponding untreated.



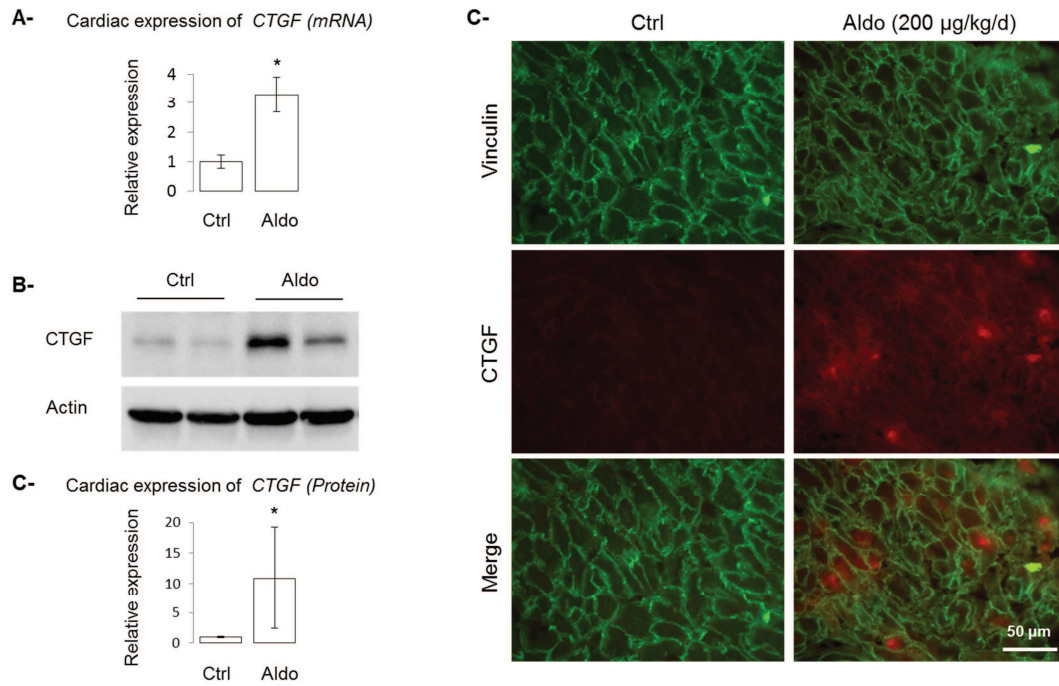
Supplemental figure S3 : Genes tested to validate MR-regulated genes in MR-Cardio mice (*Kcnk1* and *Tnnt3*) and aldosterone-regulated in MR-Cardio mice (*Adamts4* and *Trpc4*) as predicted by microarrays (up of the panel). The expression of these genes was assessed by quantitative real-time PCR confirmed microarray results (bottom of the panel). Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test followed by the Holm posthoc test to adjust for multiple comparisons. Mean±SEM (n=6 to 9). *p<0.05 vs corresponding untreated, #p<0.05 vs corresponding Ctrl.



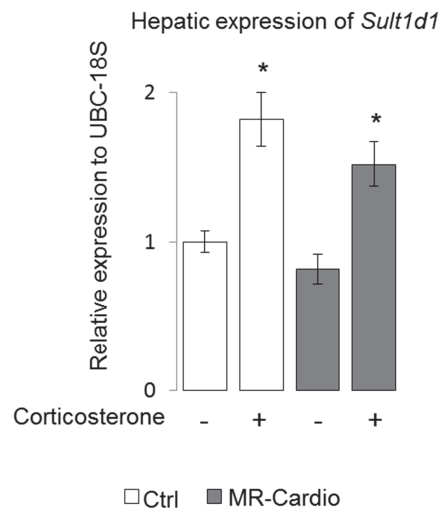
Supplemental figure S4 : Heatmap of Microarray predicted aldosterone- and MR regulated genes in MR-Cardio mice. Genes are classified according to the Fold Change of the genes differing between treated and untreated MR-Cardio mice. The FC retained is ≥ 2 and $p \leq 0.05$.



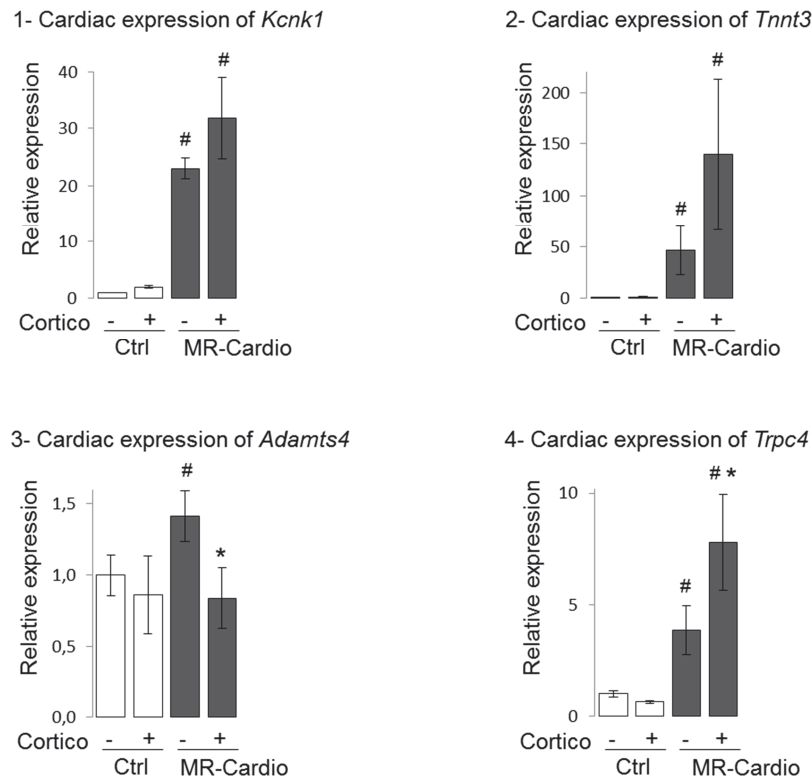
Supplemental figure S5 : Cardiac fibrosis assessment by red sirius. At the basal state, MR-Cardio mice are characterized by a moderate increase in cardiac fibrosis. Aldosterone administration did not further enhance cardiac fibrosis. Sections (4 to 5 per animal, at X10) were observed in microscope and quantified with ImageJ (V 1.43) software (NIH). N=5 per condition. Magnification X10 (Scale bar= 200 μ m). # $p < 0.05$ vs corresponding Ctrl.



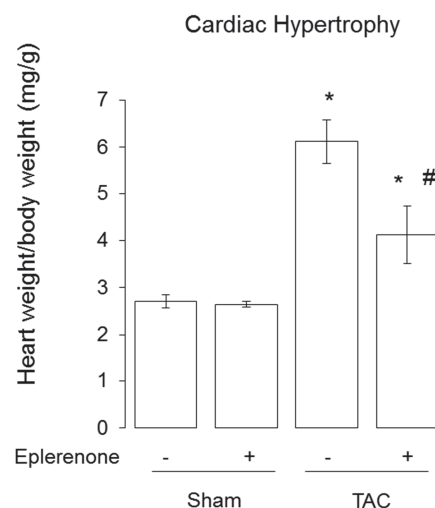
Supplemental figure S6 : A-C. Cardiac CTGF mRNA (A) and protein (B-C) expression was increased in non-transgenic mice by aldosterone (Aldo) at the dose of 200µg/Kg/d. Mean±SEM (n=3 mice per condition). * $p<0.05$ (groups were compared with Mann-Whitney test). **D.** Double immunolabeling of cardiac sections with vinculin (green) and CTGF (red). CTGF was localized in cardiomyocytes in aldo-treated mice. Scale bar: 50 µm (Magnification X40).



Supplemental figure S7 : In both Ctrl and MR-cardio mice *Sult1d1* hepatic expression was increased by corticosterone. The expression of this gene was assessed by quantitative real-time PCR. Statistical analysis was performed by 2-way anova test followed by the Holm posthoc test to adjust for multiple comparisons. Mean±SEM (n=6 to 7 per group). * $p<0.05$ vs corresponding untreated.



Supplemental figure S8 : Corticosterone did not altered cardiac expression of *Kcnk1* and *Tnnt3*. *Adamts4* and *Trpc4* were regulated by corticosterone in MR-Cardio mice. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test followed by the Holm posthoc test to adjust for multiple comparisons. Mean±SEM (n=6 to 7 per group). * $p<0.05$ vs corresponding untreated, # $p<0.05$ vs corresponding Ctrl.



Supplemental figure S9 : Thoracic aortic constriction in rats induced cardiac hypertrophy as revealed by the increase of heart weight / body weight ratio. Eplerenone partially reverses this hypertrophy. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test followed by the Holm posthoc test to adjust for multiple comparisons. Mean±SEM (n=4 to 6). * $p<0.05$ vs sham, # $p<0.05$ vs TAC-eple.

3.2.1.4 Conclusions de l'étude et discussion

Parmi les 23 gènes identifiés être stimulés par l'aldostérone, le RM, ou le complexe aldostérone/RM, CTGF nous a servi de gène candidat de premier choix pour mieux comprendre la voie de signalisation du RM dans le cœur et dans le cardiomyocyte. Notre étude montre que l'expression de CTGF est augmentée dans le cœur des souris RM-Cardio par rapport à leur souris contrôles, et que l'aldostérone potentialise cet effet. De plus, son expression est :

- localisée (par immunofluorescence) spécifiquement au niveau des cardiomyocytes *in vivo*
- augmentée par l'aldostérone (à 10^{-8} M)
- complètement prévenue par la spironolactone (à 10^{-6} M) *in vitro* dans les cellules H9C2-RM+.

Finalement, nous avons montré *in vitro* que le RM se lie à la région promotrice du gène codant pour CTGF. L'ensemble de ces résultats démontrent que le gène codant pour la protéine CTGF est un gène cible du complexe aldostérone/RM. De plus, cette étude indique, par des approches transgéniques et pharmacologiques, qu'une concentration modérément élevée d'aldostérone est capable d'activer le RM du cardiomyocyte *in vivo*.

Le CTGF est connu pour augmenter l'expression de molécules impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire comme le collagène I ou PAI-1, après induction par TGF- β ²¹². Des travaux ont aussi rapporté l'expression de CTGF dans le cœur, au niveau des fibroblastes et des cardiomyocytes^{213, 214} et elle est également modulée lors de pathologies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde²¹⁵, ou l'hypertension²¹⁶. Notre étude montre quant à elle que l'expression de CTGF est régulée spécifiquement par l'aldostérone *via* le RM du cardiomyocyte, dans un modèle d'infusion d'aldostérone seule, et dans des concentrations qui n'affectent pas la pression artérielle.

In vivo, l'aldostérone peut donc agir sur son récepteur, alors que l'enzyme de sélectivité 11 β -HSD2 est peu exprimée. Notre étude renforce le concept selon lequel d'autres mécanismes de sélectivité contribuent à l'activation du RM par l'aldostérone, dans les cibles non classiques où l'activité de la 11 β -HSD2 est faible²¹⁷. Par ailleurs, il est probable que la 11 β -HSD2 soit saturée au niveau du néphron distal ne lui permettant pas d'inactiver tous les glucocorticoïdes présents, ce qui n'empêche pas pour autant la fixation de l'aldostérone. Bien que le RM lie avec la même affinité l'aldostérone et les glucocorticoïdes, il est démontré *in vitro* que le complexe aldostérone/RM est plus stable et plus efficace pour activer la transcription de gènes que ne l'est le complexe glucocorticoïdes/RM²⁶. Par conséquent, la

stabilité de l'interaction entre le RM et son ligand permet d'optimiser l'activité transcriptionnelle du RM dans toutes les cellules où celui-ci s'exprime.

Les souris RM-Cardio traitées ou non à l'aldostérone ne développent pas de fibrose cardiaque plus marquée que les souris contrôles. Ceci est aussi observé chez des souris transgéniques dont la surexpression de CTGF dans le cardiomyocyte n'induit pas le développement de fibrose cardiaque par rapport à leurs contrôles²¹⁸. Il est donc possible que CTGF induise un environnement favorable au développement de la fibrose, plutôt que de stimuler directement celle-ci. L'aldostérone pourrait contribuer à l'apparition de cet environnement profibrosant, mais nécessite des co-activateurs comme le sel pour que la fibrose se développe.

Bien qu'artificiel, l'utilisation de ce modèle transgénique murin dans cette étude peut être un modèle reflétant la physiopathologie cardiovasculaire, dans la mesure où une augmentation de l'expression du RM cardiaque est observée dans certaines conditions. Les rats Dahl expriment le RM cardiaque environ 2 fois plus que leurs contrôles¹⁶⁵, alors que chez des rats SHRSP dont l'hypertension est très sévère (M-SHRSP, pour *malignant-SHRSP*), l'expression du RM peut augmenter plus de 10 fois par rapport à leurs contrôles²¹⁹. Ce modèle transgénique nous a également permis de mettre en évidence l'implication du remodelage ionique cardiaque¹⁷⁰, qui est à ce jour une des cibles thérapeutiques utilisée en clinique au cours du traitement des troubles du rythme cardiaque (*confer* chapitre 1.5.2.5). Allant dans ce sens, une analyse comparative de sept essais cliniques différents a montré un bénéfice du blocage du RM sur les troubles du rythme²²⁰. En effet, les antagonistes du RM réduisent de 72% le risque de développer des tachycardies ventriculaires chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires comme l'insuffisance cardiaque ou l'hypertension²²⁰.

3.2.2 Etude transcriptomique cardiaque globale

3.2.2.1 Etat de la question

Les transcriptomes cardiaques effectués chez les souris RM-Cardio et leurs contrôles, traitées ou non à l'aldostérone ou à la corticostérone, ont été à l'origine d'une exploration plus approfondie des gènes différentiellement modulés par les deux ligands du RM dans le cœur. Une analyse par *Gene Ontology* (permettant d'associer de manière significative les transcrits par rapport à un processus biologique donné) a été effectuée pour chaque condition. La suite de ce chapitre va présenter l'analyse approfondie de la comparaison du transcriptome

cardiaque des souris contrôles traitées à l'aldostérone par rapport aux souris contrôles non traitées, puis se terminera par des données préliminaires sur les souris RM-Cardio.

3.2.2.2 Objectif de l'étude

Le but de ce travail a consisté à identifier de nouveaux processus biologiques modulés par l'aldostérone, en étudiant plus particulièrement les gènes cibles spécifiquement impliqués dans la signalisation minéralocorticoïde. Le transcriptome des souris contrôles, non traitées ou traitées avec l'aldostérone, nous a permis d'approfondir les effets induits par cette hormone dans le cœur. A partir de l'analyse par *Gene Ontology*, les gènes dépendants de l'aldostérone ont presque tous pu être reliés à un processus biologique défini, avec une majorité associée aux processus du cycle cellulaire.

Nous avons donc recherché si l'aldostérone, *via* le RM, peut être impliquée dans un processus prolifératif. L'étude présentée ci-dessous, initiée par le docteur Messaoudi et dont je suis le premier auteur, a été publiée début 2015.

3.2.2.3 Article : Aldosterone Promotes Cardiac Endothelial Cells Proliferation *In Vivo*

Aldosterone Promotes Cardiac Endothelial Cell Proliferation In Vivo

Basile Gravez, Antoine Tarjus, Véronique Pelloux, Antoine Ouvrard-Pascaud, Claude Delcayre, Janelise Samuel, Karine Clément, Nicolette Farman, Frédéric Jaisser and Smail Messaoudi

J Am Heart Assoc. 2015;4:e001266; originally published January 6, 2015;

doi: 10.1161/JAHA.114.001266

The *Journal of the American Heart Association* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Online ISSN: 2047-9980

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jaha.ahajournals.org/content/4/1/e001266>

Subscriptions, Permissions, and Reprints: The *Journal of the American Heart Association* is an online only Open Access publication. Visit the Journal at <http://jaha.ahajournals.org> for more information.

Aldosterone Promotes Cardiac Endothelial Cell Proliferation In Vivo

Basile Gravez, MSc; Antoine Tarjus, PhD; Véronique Pelloux, MSc; Antoine Ouvrard-Pascaud, PhD; Claude Delcayre, PhD; Janelise Samuel, MD, PhD; Karine Clément, MD, PhD; Nicolette Farman, MD, PhD; Frédéric Jaisser, MD, PhD;* Smail Messaoudi, PhD*

Background—Experimentally, aldosterone in association with NaCl induces cardiac fibrosis, oxidative stress, and inflammation through mineralocorticoid receptor activation; however, the biological processes regulated by aldosterone alone in the heart remain to be identified.

Methods and Results—Mice were treated for 7 days with aldosterone, and then cardiac transcriptome was analyzed. Aldosterone regulated 60 transcripts (51 upregulated and 9 downregulated) in the heart (fold change ≥ 1.5 , false discovery rate < 0.01). To identify the biological processes modulated by aldosterone, a gene ontology analysis was performed. The majority of aldosterone-regulated genes were involved in cell division. The cardiac Ki-67 index (an index of proliferation) of aldosterone-treated mice was higher than that of nontreated mice, confirming microarray predictions. Costaining of Ki-67 with vinculin, CD68, α -smooth muscle actin, CD31, or caveolin 1 revealed that the cycling cells were essentially endothelial cells. Aldosterone-induced mineralocorticoid receptor-dependent proliferation was confirmed ex vivo in human endothelial cells. Moreover, pharmacological-specific blockade of mineralocorticoid receptor by eplerenone inhibited endothelial cell proliferation in a preclinical model of heart failure (transverse aortic constriction).

Conclusions—Aldosterone modulates cardiac gene expression and induces the proliferation of cardiac endothelial cells in vivo. (*J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001266 doi: 10.1161/JAHA.114.001266)

Key Words: aldosterone • heart • pressure overload • proliferation

Over the last 2 decades, there has been renewed interest in understanding the role of aldosterone and its receptor (the mineralocorticoid receptor [MR]) in cardiovascular function and disease due to the beneficial effects of pharmacological MR antagonists in patients with heart failure.^{1–3}

In animal models, pharmacological blockade of MR reverses or prevents the adverse effects of aldosterone on cardiac fibrosis.^{4,5} Experimentally, chronic infusion of aldosterone induces cardiac inflammation and fibrosis independently of increase in blood pressure.^{4,5} Aldosterone also induces cardiac oxidative stress, mainly through activation of

NADPH oxidases.⁶ Noticeably, coadministration of NaCl is essential in these models: Aldosterone alone is not sufficient to induce cardiac fibrosis.

Beside fibrosis, aldosterone also alters cardiomyocyte calcium channel current,⁷ impairs the activity of the ryanodine receptor,⁸ and promotes arrhythmia.⁹ In contrast to fibrosis and inflammation, the proarrhythmogenic properties of aldosterone do not require coadministration of salt or a pathological environment. This suggests that aldosterone alone may establish conditions that sensitize cardiac tissue to other triggers; however, the biological processes activated by aldosterone in the heart in the absence of added sodium are far from being fully understood.

The aim of this study was to identify new aldosterone-regulated biological processes that might contribute to cardiac diseases. We used an approach consisting of pangenomic analysis of genes regulated in vivo in the mouse heart after administration of a low dose of aldosterone. Treatment duration was short (1 week) to favor the identification of primary aldosterone targets rather than those involved in compensatory or adaptive processes occurring after chronic administration of aldosterone. We report that moderate increase in plasma aldosterone concentration regulates cardiac expression of genes involved in proliferation and promotes proliferation of cardiac endothelial cells (ECs).

From the Inserm U1138, Team 1, 15 rue de l'école de médecine, Paris, France (B.G., A.T., N.F., F.J., S.M.); INSERM-UMR 1166 Team 6- GH Pitié-Salpêtrière, 83 Bd de l'hôpital, Paris, France (V.P., K.C.); UMR 644 Inserm-Université de Rouen. 22, Boulevard Gambetta, Rouen, France (A.O.-P.); Inserm U942, 41 Boulevard de la chapelle, Paris, France (C.D., J.S.).

*Dr Jaisser and Dr Messaoudi shared senior authorship.

Correspondence to: Smail Messaoudi, PhD, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe 1, Escalier E, 1^{er} étage. 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France. E-mail: smail.messaoudi@crc.jussieu.fr

Received July 11, 2014; accepted November 20, 2014.

© 2015 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley Blackwell. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Moreover, pharmacological MR antagonism prevents endothelial proliferation observed in a rat model of heart failure.

Materials and Methods

Mice

Four-month-old male mice (B6D2) purchased from Janvier-Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used for this study. The use of animals was in accordance with the guidelines of the European Community and approved by our institutional animal care and use committee and thus has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. Aldosterone (A9477; Sigma-Aldrich) was resuspended in ethanol, diluted 10× in saline, then infused (60 µg/kg per day) via osmotic minipumps (Alzet) (before minipump implantation, mice were anesthetized by xylazine or ketamine administration) for 1 week (n=6 to 9 per group) or 4 weeks (n=8 per group), as described previously.¹⁰ This allowed a moderate increase in plasma aldosterone levels (5-fold increase, 2.9 nmol/L versus 0.6 nmol/L in control mice).¹⁰ Infusion of the vehicle (ethanol 10% in saline) had no effects on the parameters studied.

Blood Pressure Measurement

Systolic blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography in trained conscious mice using a BP-2000 Visitech system (Bioseb).

Tissue Sampling

Hearts were rinsed in cold PBS, weighed, and cut into 2 parts (transversal cut). The apex was frozen for mRNA and protein extraction. The base was immersed in Tissue-Tek (Sakura Finetek France) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane for morphological studies. Kidneys were rinsed in cold PBS and weighed. All samples were frozen in liquid nitrogen and kept at −80°C.

Microarray and Gene Expression Analysis

Five mice per group were used to carry out microarray experiments (1 week aldosterone treatment). Total RNA was prepared from ventricle samples with the RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions, and its quality was assessed with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Microarray experiments were carried out using the mouse GE 4x44K v2 microarray kit (Agilent Technologies). Labeling of the RNAs, hybridization (1 animal per array), and scanning of the microarrays were performed according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using GeneSpring software (Agilent Technologies). The false discovery rate and fold-change threshold retained were 1% and ≥1.5, respectively. Quantitative real-time polymerase chain reaction was carried out, as described previously.¹¹ Primer sequences are listed in Table 1.

Table 1. Primer Sequences

Genes	Forward Primer	Reverse Primer
18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TCTTGGCAAATGCTTTCGC
Ang1	GAAGGGAACCGAGCTACTC	ACCACCAACCTCCTGTTAGC
Birc5	GTGACGCCATCATGGGAGCTCC	AGGCTCGTTCTCGGTAGGGCAG
Ccnb1	TGATTTTGGAGGAGCCATGGCGCTC	GCACTCTTGCCTGTAGCTCTTCGC
Cdk1	AGTAACGAGCCGAGCCCAGCA	TCGGCCTTGCCAGAGCGTTTG
Fgf2	GCCAACCGGTACCTTGCTAT	GTCCCGTTTTGGATCCGAGT
Icam1	TCCGCTACCATCACCGTGTATT	TGGCCTCGGAGACATTAGAGAAC
Mcp1	ATCCCAATGAGTAGGCTGGAGAGC	CAGAAGTGCTTGAGGTGTTGTG
Neil3	ACCGCCGTTGTGTTCTCCGA	TGGAGCGCTTGCCATGTCTGC
Pgf	TCTGCTGGGAACAACACA	GTGAGACACCTCATCAGGTAT
Tnfa	GGGACAGTGACCTGGACTGT	AGTGAATTCGGAAGCCCAT
Ubc	AGCCCAGTGTTACCAACAG	ACCCAAGAACAAGCACAAGG
Vcam	CTGGGAAGCTGGAACGAAGT	GCCAAACACTTGACCGTGAC
Vegf-a	AGCAACATCACCATGCAGATCATGC	TGAACAAGGCTCACAGTGAACGC

Ang1 indicates angiotensinogen; Birc5, Baculoviral IAP repeat containing 5; Ccnb1, cyclin B1; Cdk1, cyclin-dependent kinase 1; Fgf2, fibroblast growth factor 2; Icam1, intercellular adhesion molecule 1; Mcp1, macrophage chemo-attractant protein 1; Neil3, Nei like 3; Pgf, placental growth factor; Tnfa, tumor necrosis factor α ; Ubc, ubiquitin; Vcam, vascular cell adhesion molecule 1; VEGF-a, vascular endothelial growth factor A.

Gene Ontology Analysis

Gene ontology (GO) analysis was carried using FunNet¹² (<http://www.funnet.info/>). FunNet integrates experimental gene expression data and knowledge about the biological roles of transcripts available in genomic annotation systems. Briefly, FunNet performs functional profiling of gene expression data to identify a set of significant (ie, overrepresented) biological themes characterizing the analyzed transcripts (ie, cellular processes, pathways, and molecular functions in which the analyzed transcripts are involved). The options provided with this type of analysis are related to the gene annotation systems to be used for functional profiling of transcripts and to the type of gene-enrichment computation performed for GO categories (ie, the 3 main conceptual axes of the GO lattice). The annotation systems currently available in FunNet are those provided by the Gene Ontology Consortium and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Gene Network Building

The gene network was generated through the use of Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems). A data set containing gene identifiers and corresponding expression values was uploaded into the application. Each identifier was mapped to its corresponding object in the Ingenuity Knowledge Base. The genes, the expression of which was significantly differentially regulated, are called *network-eligible molecules* and were overlaid onto a global molecular network developed from information contained in the Ingenuity Knowledge Base. Networks of network-eligible molecules were then algorithmically generated based on their connectivity.

Immunofluorescence

Left ventricular frozen 4- μ m sections were stained using primary antibodies against Ki-67 (ab15580; Abcam), CD31 (550274; BD Pharmingen), phospho-histone H3 (p-H3; CS9701; Cell Signaling), vinculin (V9131; Sigma-Aldrich), FITC-coupled caveolin 1 (sc894-FITC; Santa Cruz Biotechnology), α -smooth muscle actin isoform (ab7817; Abcam), and CD68 (ab53444; Abcam). Briefly, frozen sections were fixed in 4% paraformaldehyde and then washed with PBS Tween 20. Subsequently, sections were blocked with 5% bovine serum albumin for 30 minutes and incubated with the primary antibody overnight at 4°C. After rinsing with PBS, the sections were incubated for 1 hour with the appropriate secondary antibody. ECs and cycling or mitotic nuclei were identified with CD31 (or caveolin 1) and Ki-67 or p-H3 antibodies, respectively. Because Ki-67 and p-H3 are nuclear antigens and CD31 and caveolin 1 are membrane proteins, Ki-67-positive and p-H3-positive nuclei are surrounded with

CD31 or caveolin 1 staining. Vinculin antibody allowed the identification of cardiomyocyte outlines, whereas α -smooth muscle actin and CD68 antibodies detected smooth muscle cells and macrophages, respectively. A minimum of 5 fields per section was recorded at $\times 10$ and $\times 20$ using a Leica camera equipped with a fluorescent Leica DMR (Leica Microsystems). The Ki-67 or p-H3 index is defined as the number of positive Ki-67 or p-H3 nuclei per total nuclei. The numbers of capillaries and positive and total nuclei were determined using ImageJ (version 1.43) software. The capillary density was defined as the number of capillaries per surface unit.

Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Aldosterone Treatment

Human umbilical vein ECs were purchased from ScienCell Research Laboratories (code 8000). Cells were grown in collagen-coated flasks with endothelial basal medium 2 supplemented with endothelial cell growth medium 2 (CC3162; Lonza). For experiments, cells were transferred into 6-well plates at a confluence of 15%. They were grown in serum-free medium 24 hours before stimulation. Aldosterone (Sigma-Aldrich) was initially dissolved in ethanol at a concentration of 10^{-3} mol/L. Cells were treated with aldosterone (10^{-8} mol/L) or vehicle (containing the same proportion of ethanol as treated cells) for 96 hours. Medium was renewed every 48 hours. To investigate the specificity of action of aldosterone, the MR antagonist spironolactone (S3378; Sigma-Aldrich) was used (dissolved in ethanol) at the final concentration of 10^{-6} mol/L.

Cell-Proliferation Assessment

Cell proliferation was assessed with the quick cell proliferation kit (65475; Biorad). Briefly, this assay is based on the cleavage of the tetrazolium salt WST-1 to formazan by cellular mitochondrial dehydrogenases. Expansion of viable cell numbers results in an increase in the overall activity of the mitochondrial dehydrogenases in the sample, corresponding to an increase in formazan dye metabolism. The formazan dye produced by the viable cells is measured at an absorbance of 440 nm using a standard multiwell spectrophotometer. Absorbance is directly proportional to the number of cells.

Thoracic Aortic Constriction and Eplerenone Treatment

Pressure overload was produced by thoracic aortic constriction, as previously described.¹⁰ Briefly, 3-week-old male rats

(body weight 60 ± 1 g) were anaesthetized with intraperitoneal injection of xylazine (50 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). Left ventricle pressure overload was then produced by coarctation of the ascending thoracic aorta with a partially occluded Weck Hemoclip. The same procedure was performed on sham-operated animals, but no clip was placed around the aorta. Animals were divided into 4 groups: (1) sham operated ($n=5$), (2) sham operated plus eplerenone ($n=4$), (3) pressure-overloaded rats ($n=5$), and (4) pressure-overloaded rats plus eplerenone ($n=6$). Animals were kept under identical housing conditions and sacrificed after 3 months. Eplerenone (E6657; Sigma-Aldrich), a specific MR blocker, was incorporated in food and available ad libitum.

Statistics

The results are reported as mean \pm SEM. The Shapiro–Wilk and Levene tests were used to analyze normality and variance or homogeneity of residuals, respectively. Statistical analysis was performed by *t* test or Mann–Whitney test. For aldosterone with or without spironolactone treatment on human umbilical vein ECs, we used a 2-factor ANOVA with repeated-measure analysis followed by Tukey's post hoc test. For the thoracic aortic constriction experiment, the Kruskal–Wallis test was performed. The Holm post hoc test was used to adjust for multiple comparisons. Statistical analysis was performed with SigmaPlot (version 11.0) software. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Cardiac Transcriptome

One-week low-dose aldosterone infusion without increase in sodium intake did not alter blood pressure, body weight, or heart weight (Table 2). Transcriptomic analysis was performed on cardiac mRNA isolated from aldosterone-treated and control mice. Sixty-five probes corresponding to 60 transcripts (51 upregulated and 9 downregulated) (Figure 1A

and 1B; Table 3) were differentially hybridized between aldosterone-treated and control mice (fold change of ≥ 1.5 -fold and false discovery rate $< 1\%$). The microarray data were confirmed by quantitative polymerase chain reaction (Figure 1C).

Gene Ontology Analysis

We then performed a GO analysis of the upregulated transcripts to identify the biological processes modulated by aldosterone (the number of transcripts downregulated was too low to perform a significant GO analysis). The GO analysis was based on National Center for Biotechnology Information Entrez Gene identifier (which allows unambiguous identification of transcripts) in a manner that transcripts identified more than once (with different probe names) did not artificially enrich a GO category. Among the 51 aldosterone-upregulated transcripts, 43 have at least 1 GO biological process annotation; therefore, the rate of coverage was 84%. Aldosterone-regulated cardiac transcripts were overrepresented in GO categories involved in cell proliferation (cell cycle, cell division, mitosis) (Figure 2A). For example, 66% of aldosterone-regulated transcripts were annotated with the *cell cycle* GO biological process annotation. Only 0.04% of the annotated transcripts on the microarray (494 of 14 021) were marked with this annotation, indicating very significant enrichment of this category ($P < 0.0001$).

Cardiac Proliferation Assessment

We assessed cell proliferation in cardiac sections of aldosterone-treated (1 week) and control mice, probing Ki-67 as a marker of cell cycle activity¹³ and p-H3 as a marker of mitotic activity¹⁴ (Figure 2B). Absolute numbers of Ki-67 antigen-labeled cells were consistently higher than those of p-H3-labeled cells. Ki-67 protein is present during all active phases of the cell cycle (G_1 , S, G_2 , and mitosis), whereas histone H3 is phosphorylated only during mitosis.^{13,14} Aldosterone increased Ki-67 index by 300% ($P < 0.05$) (Figure 2C). Similar

Table 2. General Characteristics of Mice

	1 Week		4 Weeks	
	Control ($n=6$)	Aldo ($n=9$)	Control ($n=8$)	Aldo ($n=8$)
Body weight, g	27.9 ± 0.4	28.7 ± 0.4	33.9 ± 0.6	32.9 ± 0.2
Heart weight, mg	132.5 ± 3.1	136.9 ± 3.0	172.3 ± 5.4	176.2 ± 4.1
Blood pressure, mm Hg	126.1 ± 3.1	127.2 ± 2.4	127.3 ± 2.4	131.6 ± 1.8

Values are Mean \pm SEM. Aldo indicates aldosterone.

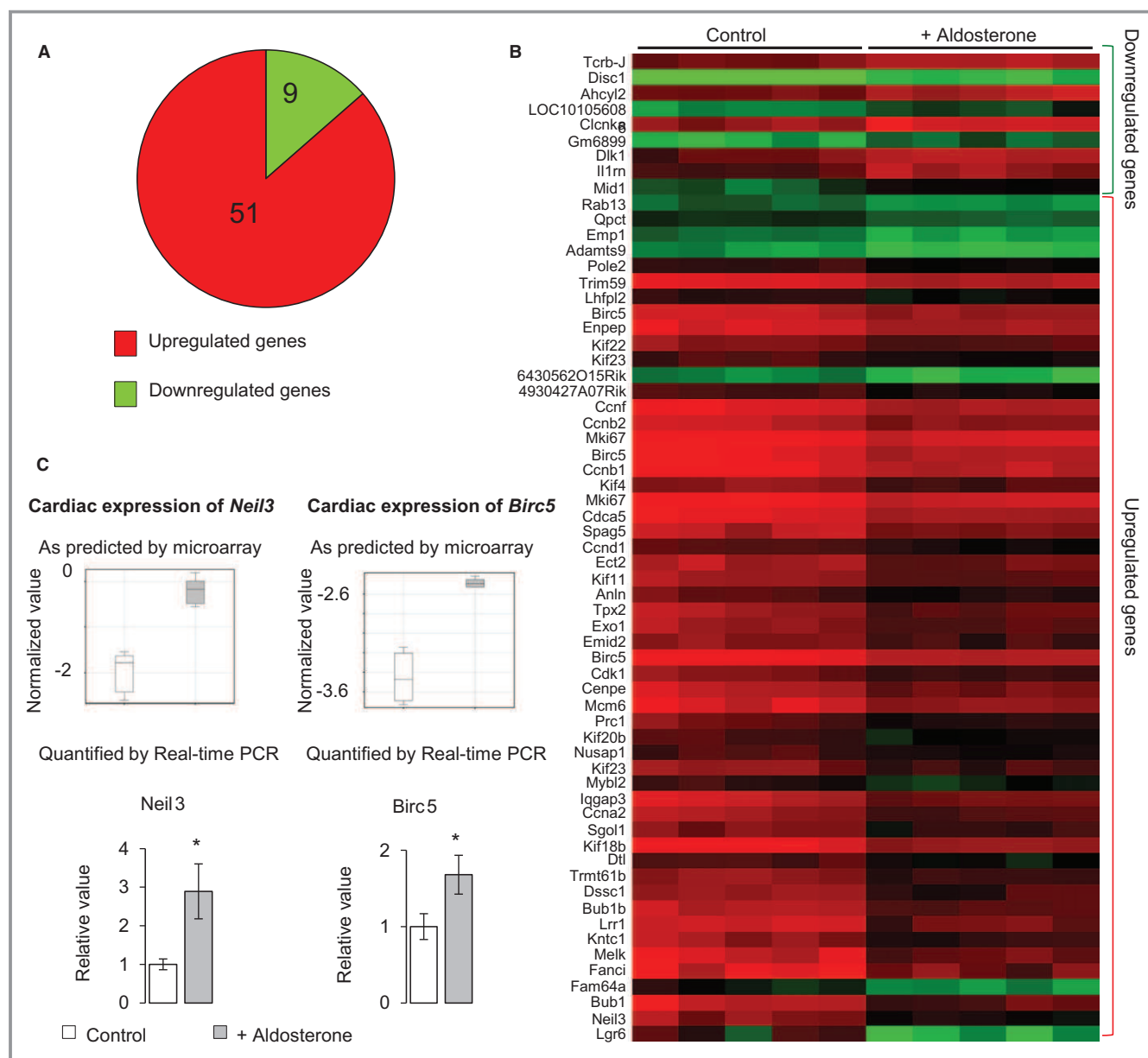


Figure 1. A, Schematic representation of aldosterone-regulated genes, as predicted by microarray analysis. Aldosterone (1-week treatment) regulated 60 genes: 51 were upregulated, and 9 were downregulated (fold change ≥ 1.5 , false discovery rate $< 1\%$). B, Heat map of microarray-predicted aldosterone-regulated genes. Genes are classified according to the fold change of the genes. C, Genes tested to validate aldosterone-regulated genes as predicted by microarrays (top of the panel; control $n=5$ and aldosterone $n=5$). The expression of these genes was assessed by quantitative real-time PCR and confirmed microarray results (bottom of the panel, Ctrl $n=6$ and Aldo $n=9$). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. Mean \pm SEM. * $P < 0.05$. PCR indicates polymerase chain reaction.

variation was observed with p-H3 cardiac immunostaining (Figure 2C).

Master Genes

To identify genes possibly involved in aldosterone-induced cardiac cell proliferation, we proceeded to a network analysis. The network was generated from the aldosterone-regulated

genes through the use of an Ingenuity Pathway Analysis system. Among the 60 aldosterone-regulated genes, 28 were eligible to build a network based on the Ingenuity Knowledge Base. Among the genes used to build the network, we focused on those interacting with the greatest number of other genes in the cytoplasm—cyclin B1 (*Ccnb1*), with 10 interactions—and the nuclei—cyclin dependent kinase 1 (*Cdk1*), with 16 interactions (Figure 2D). These genes play crucial roles in cell

Table 3. Aldosterone-Regulated Genes in the Heart

Gene Symbol	Reg	P Value	FC	Description
Tcrb-J	Down	0.0043	1.73	<i>Mus musculus</i> rearranged T-cell receptor beta variable region (Vb17a). [X61758]
Disc1	Down	0.0048	1.74	Disrupted in schizophrenia 1 [ENSMUST00000122389]
Ahcy12	Down	0.0065	1.81	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2 [ENSMUST00000150365]
LOC101056086	Down	0.0069	1.86	PREDICTED: uncharacterized LOC101056086 (LOC101056086), [XM_003945428]
Clcnka	Down	0.0079	1.90	Chloride channel Ka (Clcnka), TV 1, [NM_024412]
Gm6899	Down	0.007	2.00	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230320C11 product:hypothetical protein, full insert sequence. [AK140159]
Dlk1	Down	0.0069	2.03	Delta-like 1 homolog (<i>Drosophila</i>), TV 1, [NM_010052]
Il1rn	Down	0.0089	2.08	Interleukin 1 receptor antagonist, TV 2, [NM_001039701]
Mid1	Down	0.0047	2.21	Midline 1 [ENSMUST00000149258]
Rab13	Up	0.0069	1.51	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230212B15 product:GTP-binding protein rab13 (fragment) homolog [<i>Rattus norvegicus</i>], full insert sequence. [AK080805]
Qpct	Up	0.0024	1.51	Glutamyl-peptide cyclotransferase (glutamyl cyclase), [NM_027455]
Emp1	Up	0.0061	1.55	Epithelial membrane protein 1, [NM_010128]
Adamts9	Up	0.0073	1.55	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9, [NM_175314]
Pole2	Up	0.0049	1.56	Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit), [NM_011133]
Trim59	Up	0.0035	1.57	Tripartite motif-containing 59, [NM_025863]
Lhfp12	Up	0.0069	1.62	Lipoma HMGIC fusion partner-like 2, [NM_172589]
Birc5	Up	0.0061	1.62	Baculoviral IAP repeat-containing 5, TV 1, [NM_009689]
Enpep	Up	0.0047	1.63	Glutamyl aminopeptidase, [NM_007934]
Kif22	Up	0.0069	1.65	Kinesin family member 22, [NM_145588]
Kif23	Up	0.0089	1.68	Kinesin family member 23, [NM_024245]
6430562015Rik	Up	0.0081	1.69	Adult male olfactory brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6430562015 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK032482]
4930427A07Rik	Up	0.0047	1.72	RIKEN cDNA 4930427A07 gene, [NM_134041]
Ccnf	Up	0.0049	1.75	Cyclin F, [NM_007634]
Ccnb2	Up	0.0062	1.77	Cyclin B2, [NM_007630]
Mki67	Up	0.0085	1.77	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67, [NM_001081117]
Birc5	Up	0.0057	1.77	Baculoviral IAP repeat-containing 5, TV 3, [NM_001012273]
Ccnb1	Up	0.0067	1.82	Cyclin B1, [NM_172301]
Kif4	Up	0.0057	1.83	Kinesin family member 4, [NM_008446]
Mki67	Up	0.0083	1.84	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67, [NM_001081117]
Cdca5	Up	0.0024	1.85	Cell division cycle associated 5, [NM_026410]
Spag5	Up	0.0062	1.88	Sperm associated antigen 5, [NM_017407]
Ccnd1	Up	0.0035	1.90	Cyclin D1, [NM_007631]
Ect2	Up	0.0074	1.90	Ect2 oncogene, TV 1, [NM_007900]
Kif11	Up	0.0024	1.92	Kinesin family member 11, [NM_010615]
Anln	Up	0.0073	1.93	Anillin, actin binding protein, [NM_028390]
Tpx2	Up	0.0079	1.93	TPX2, microtubule-associated protein homolog (<i>Xenopus laevis</i>), TV 2, [NM_028109]
Exo1	Up	0.0062	1.93	Exonuclease 1, [NM_012012]
Emid2	Up	0.0065	1.94	EMI domain containing 2 [ENSMUST00000111103]
Birc5	Up	0.0024	1.95	Baculoviral IAP repeat-containing 5, TV 3, [NM_001012273]

Continued

Table 3. Continued

Gene Symbol	Reg	P Value	FC	Description
Cdk1	Up	0.0047	1.98	Cyclin-dependent kinase 1, [NM_007659]
Cenpe	Up	0.0064	2.00	Centromere protein E, [NM_173762]
Mcm6	Up	0.0047	2.01	Minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, <i>Saccharomyces pombe</i>) (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), [NM_008567]
Prc1	Up	0.0069	2.05	Protein regulator of cytokinesis 1, [NM_145150]
Kif20b	Up	0.0069	2.06	Kinesin family member 20B, [NM_183046]
Nusap1	Up	0.0057	2.08	Nucleolar and spindle associated protein 1, TV 1, [NM_133851]
Mybl2	Up	0.0073	2.13	Myeloblastosis oncogene-like 2, [NM_008652]
Iqgap3	Up	0.0065	2.13	IQ motif containing GTPase activating protein 3, [NM_001033484]
Ccna2	Up	0.0047	2.16	Cyclin A2, [NM_009828]
Sgol1	Up	0.0047	2.18	Shugoshin-like 1 (<i>Saccharomyces pombe</i>), [NM_028232]
Kif18b	Up	0.0089	2.27	Kinesin family member 18B, [NM_197959]
Dtl	Up	0.0003	2.28	Denticleless homolog (<i>Drosophila</i>), [NM_029766]
Trmt61b	Up	0.0035	2.28	tRNA methyltransferase 61B, TV 2, non-coding RNA [NR_027952]
Dscc1	Up	0.0016	2.29	Defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), [NM_183089]
Olfir631	Up	0.0064	2.46	Olfactory receptor 631, [NM_001271020]
Bub1b	Up	0.0003	2.47	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), [NM_009773]
Lrr1	Up	0.0047	2.59	Leucine rich repeat protein 1, [NM_001081406]
Kntc1	Up	0.0047	2.76	Kinetochore associated 1, [NM_001042421]
Melk	Up	0.0049	2.92	Maternal embryonic leucine zipper kinase, [NM_010790]
Fanci	Up	0.0065	2.95	Fanconi anemia, complementation group I, [NM_145946]
Fam64a	Up	0.0049	2.95	Family with sequence similarity 64, member A, [NM_144526]
Bub1	Up	0.0061	2.96	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), TV 2, [NM_009772]
Nei3	Up	0.0027	3.36	Nei like 3 (<i>Escherichia coli</i>), [NM_146208]
Lgr6	Up	0.0065	6.28	Adult male aorta and vein cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A530037C04 product:CDNA FLJ14471 FIS, CLONE MAMMA1001030, WEAKLY SIMILAR TO LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR homolog [<i>Homo sapiens</i>]. [AK040883]

Some genes appear more than 1 time because the different probe corresponding to these genes have been differentially hybridized between aldosterone-treated and control mice. FC indicates absolute fold change; *P*, corrected *P* value; Reg, regulation; TV, transcript variant.

Accession number: for all the genes, accession number provided is the National Center for Biotechnology Information GenBank accession number, except for Disc1, Ahcyl2, Mid1, and Emid2, which is the Ensembl accession number.

cycling and proliferation. Consistent with Ki-67 increased index, quantitative polymerase chain reaction confirmed that cardiac expression of these genes was significantly increased by aldosterone (Figure 2E).

Identification of the Cycling Cells

To identify the cell type that proliferates on aldosterone infusion, we performed double immunostaining of cardiac sections from aldosterone-treated and control mice. In aldosterone-treated mice, Ki-67–positive nuclei were localized around the cardiomyocytes that were delineated by vinculin immunostaining (Figure 3). Very few Ki-67–positive nuclei colocalized with the α -smooth muscle actin (a smooth muscle cell marker) or CD68 (a macrophage marker) (Figure 3). The

majority of Ki-67–positive nuclei were colocalized within CD31–positive cells, indicating that most of the activated cells were ECs (Figure 4A). Similar results were obtained with caveolin 1, another marker of ECs (Figure 4A). P-H3 was also colocalized within caveolin 1–positive cells, strengthening our previous observation (Figure 4A). Caveolin 1 specificity for ECs was assessed by double immunostaining of ECs with CD31 and caveolin 1 (Figure 4B). We conclude that aldosterone promotes EC proliferation in vivo.

Cardiac expression of several proangiogenic growth factors (vascular endothelial growth factor A [VEGFA], placental growth factor [PGF], angiotensin 1 [ANG1], and fibroblast growth factor 2 [FGF2]) was not significantly altered by aldosterone treatment for 1 week (Figure 4C). Similarly, the expression of proinflammatory molecules (tumor necrosis

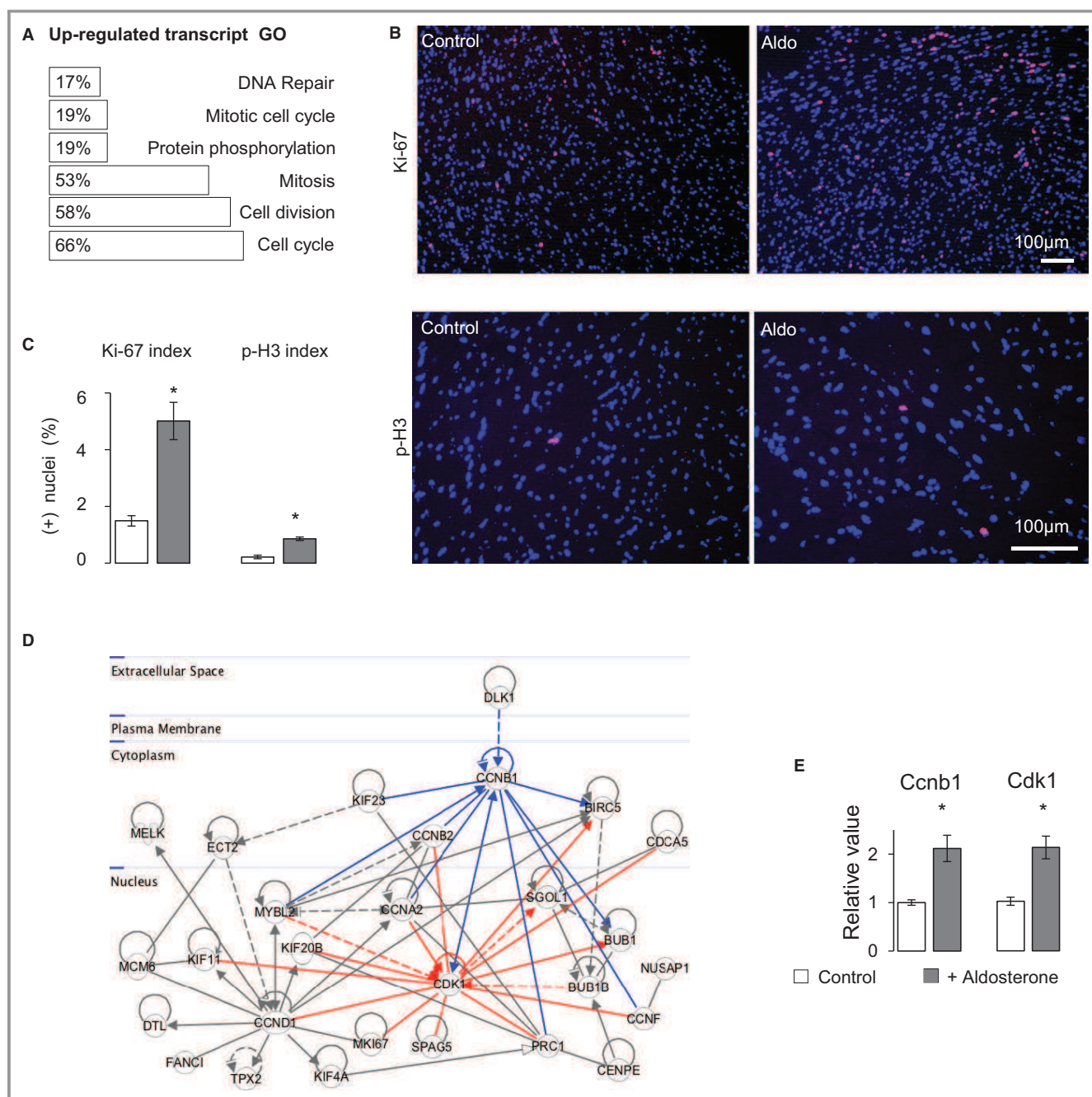


Figure 2. A, Gene ontology analysis of aldosterone-upregulated genes with FunNet software. Aldosterone-upregulated genes were overrepresented in gene ontology categories involved in cell cycle, proliferation, and mitosis. B, Ki-67 and p-H3 immunolabeling of cardiac sections (4 µm) of aldosterone-treated and control mice. In blue, DAPI-stained nuclei; in red, Ki-67 positive nuclei. C, Cardiac Ki-67 and p-H3 index quantification. Aldosterone induced an increase in cardiac Ki-67 and p-H3 indexes in mice (control n=6 and aldosterone n=9). D, The network was generated using Ingenuity Pathway Analysis software from the aldosterone-regulated genes. Cyclin B1 (*Ccnb1*) and cyclin dependent kinase 1 (*Cdk1*) (highlighted in red) were the most connected genes. E, Cardiac expression of *Ccnb1* and *Cdk1* genes was increased by aldosterone. Expression of these genes was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (normalized to 18S and ubiquitin C genes) (control n=6 and aldosterone n=9). Statistical analysis was performed by Mann–Whitney test. Mean±SEM. **P*<0.05 vs controls. Aldo indicates aldosterone; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; p-H3, phospho-histone H3.

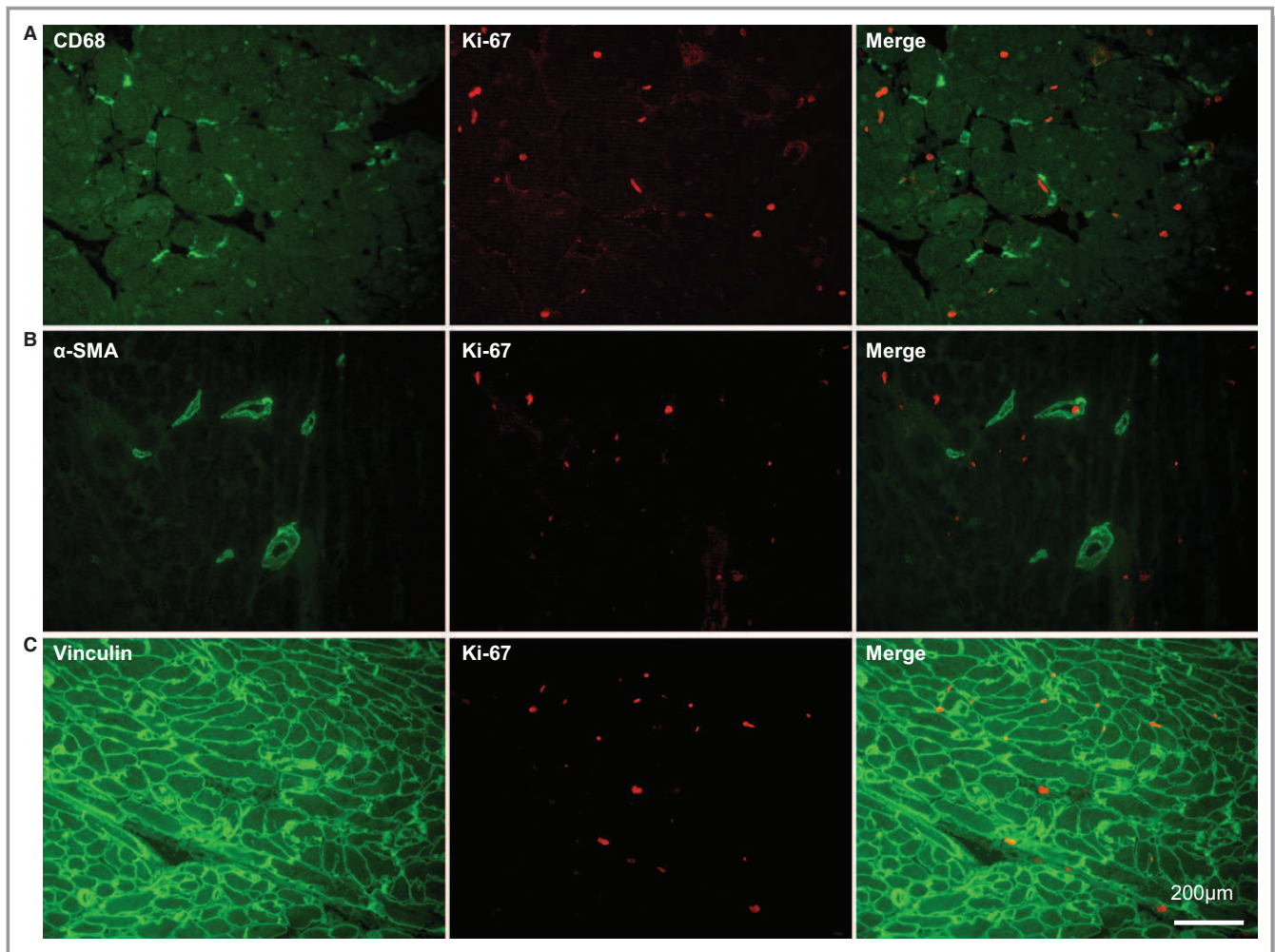


Figure 3. Double immunolabeling of cardiac sections from aldosterone-treated mice. Cardiac sections (4 μ m) were labeled with anti-Ki-67 and anti-CD68 (A), α -SMA (B) or vinculin (C) antibodies. Ki-67–positive nuclei were localized all around cardiomyocytes in the interstitium. Very few Ki-67–positive nuclei colocalized with α -SMA or CD68. α -SMA indicates α -smooth muscle actin.

factor α , macrophage chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1 [ICAM-1], and vascular cell adhesion molecule 1) that have been associated with proangiogenic properties of aldosterone in the retina¹⁵ was not altered (Figure 4C).

Aldosterone induction of EC proliferation was further studied ex vivo in human umbilical vein ECs. Aldosterone (10^{-8} mol/L) enhanced human umbilical vein EC proliferation in a time-dependent manner. This effect was MR dependent because it was prevented by spironolactone addition (Figure 4D).

Aldosterone Induces Angiogenesis in the Heart

To study whether increase in EC proliferation was accompanied by angiogenesis, we analyzed capillary density. No modifications were detected after 1 week of aldosterone treatment.

Longer treatment (4 weeks) did not alter blood pressure and body weight (Table 2). The heart was not hypertrophied, but capillary density was significantly increased, albeit to a limited extent (+7%, $P<0.05$) (Figure 5A and 5B). The expression of *Ccnb1* and *Cdk1* was not altered, whereas Ki-67 index was moderately increased (+38%, $P<0.05$; less than after 1 week treatment [+300%] [Figure 2C]) (Figure 5C and 5D). Expression of *VegfA* was increased (+40%, $P<0.005$), whereas expression of *Pgf*, *Ang1*, and *Fgf2* was not (Figure 5E).

Endothelial Cell Proliferation in Heart Failure

To study whether aldosterone may play a role in cardiac pathologies by promoting EC proliferation, we used a model of heart failure in rat (thoracic aortic constriction) that we characterized in a previous study.¹⁰ Thoracic aortic constriction induced an increase in Ki-67 index (+61%, $P<0.05$) that

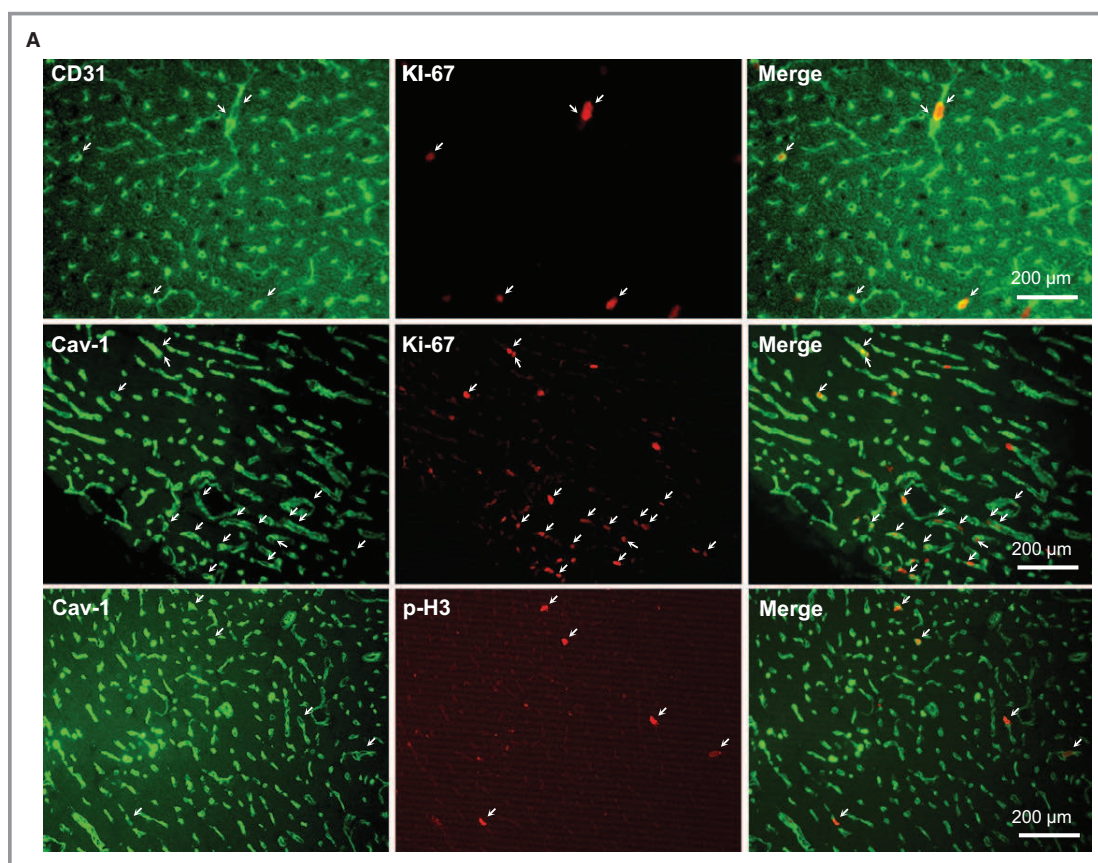


Figure 4. A, Double immunolabeling of cardiac sections from aldosterone-treated mice (1 week). Cardiac sections (4 μ m) were labeled with anti-Ki-67 and either anti-CD31 or anti-Cav-1 antibodies. Sections were also colabeled with anti-p-H3 and Cav-1. A very large fraction of Ki-67 positive nuclei colocalized within CD31 and Cav-1-positive cells, indicating that most of the activated cells were endothelial cells. P-H3-positive nuclei also colocalized within Cav-1 positive cells. B, Double immunolabeling of cardiac sections. Cardiac sections (4 μ m) were labeled with anti-CD31 and anti-Cav-1 antibodies. All CD31 (+) cells are positives for Cav-1 expression, and all Cav-1 (+) cells are positives for CD31 expression. Cav-1 is thus specific for endothelial cells. C, Cardiac expression of proangiogenic genes (angiopoietin1 [*Ang1*], fibroblast growth factor 2 [*Fgf2*], placental growth factor [*Pgf*], and vascular endothelial growth factor A [*Vegf-a*] and pro-inflammatory tumor necrosis factor α [*Tnf- α*], macrophage chemo-attractant protein 1 [*Mcp1*], vascular cell adhesion molecule 1 [*Vcam1*], and intercellular adhesion molecule 1 [*Icam1*]) was not increased by aldosterone. Expression of these genes was assessed by Q-PCR (normalized to 18S and ubiquitin C genes) (control n=6 and aldosterone n=9). Statistical analysis was performed by Mann–Whitney test. Mean \pm SEM. * P <0.05 vs controls. D, Assessment of endothelial cells (HUVEC) proliferation. HUVEC were treated with 10^{-8} mol/L aldosterone (with or without spironolactone 10^{-6} mol/L) for 48 to 96 hours. Cell number was assessed by measurement of the absorbance of medium at 440 nm after the cleavage of the tetrazolium salt WST-1 to formazan by viable cells. Aldosterone induces an increase in cell number at 96 hours. This effect is abolished by spironolactone (6 wells per condition). Statistical analysis was performed by 2-factor ANOVA with repeated measures, followed by Tukey's post hoc test. Mean \pm SEM. * P <0.05 vs untreated cells; $^{\dagger}P$ <0.05 vs spironolactone-treated cells. Aldo indicates aldosterone; Cav-1 indicates caveolin 1; Ctrl, control; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; p-H3, phospho-histone H3; Q-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; spi, spironolactone.

was normalized by eplerenone, a specific MR blocker (Figure 6A). Most of the Ki-67-positive cells colocalized within caveolin 1-positive cells, indicating that proliferating cells were endothelial (Figure 6B). Consequently, in this model of heart failure, MR activation participates in proliferation of ECs.

Discussion

Using a strategy coupling pharmacological and genomic approaches, this study demonstrates that a modest increase in plasma aldosterone concentration that is within the pathophysiological range induces expression of genes

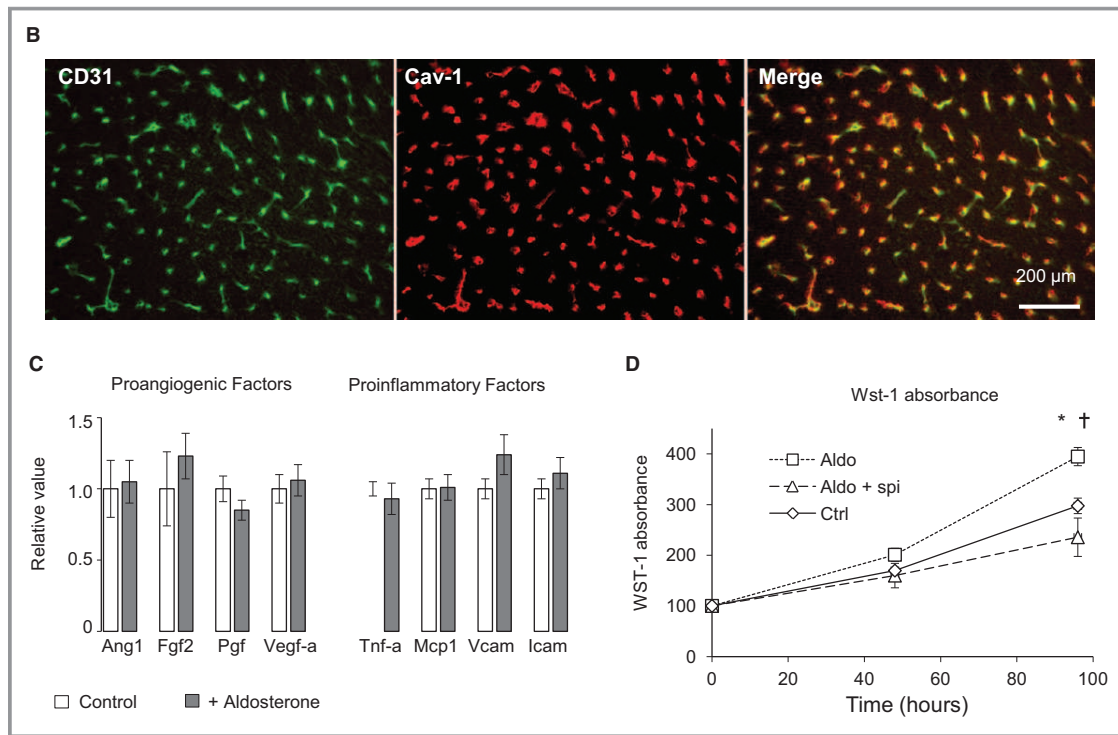


Figure 4. Continued

involved in cell cycle and promotes cardiac EC proliferation after 1 week and angiogenesis after 4 weeks.

The effects of aldosterone on ECs and angiogenesis are controversial. In mice, aldosterone impairs ECs sprouting from vascular segments.¹⁶ In rats, aldosterone decreased the number of circulating endothelial progenitor cells,¹⁷ and in patients with hyperaldosteronism, the number of circulating endothelial progenitor cells was inversely correlated with plasma aldosterone concentration.¹⁸ Proliferative effects have also been reported in vivo: Aldosterone enhances neovascularization in an experimental model of ischemia,¹⁹ prevents capillary rarefaction in a model of type 1 diabetes,²⁰ and stimulates pathological angiogenesis in the retina.²¹ Ex vivo studies suggest that this apparent paradox may be dose dependent. At high concentrations (10^{-5} to 10^{-6} mol/L, far above pathological conditions), aldosterone attenuated human endothelial progenitor cell proliferation and angiogenesis, whereas lower concentrations (10^{-9} to 10^{-8} mol/L, the biological range) of aldosterone enhanced endothelial progenitor cell and retinal EC proliferation.^{18,21} Furthermore, at pathophysiological concentrations (10^{-9} to 10^{-8} mol/L), aldosterone increased the formation of tubules by bovine retinal ECs in addition to promoting their proliferation.²¹ In addition to the dose, in vivo treatment duration and confounding factors (eg, pathologies such as diabetes and heart failure) are parameters that might explain these

apparent discrepancies in the literature. Further studies are required for a better understanding of the paradoxical angiogenic properties of aldosterone.

The pathophysiological consequences of aldosterone-dependent increase in cardiac EC proliferation are unknown. ECs are crucial for heart function by regulating vascular permeability, modulating the diameter of blood vessels in response to hemodynamic and hormonal stimuli, regulating leukocyte recruitment and adhesion, and preventing blood coagulation.²² Several ex vivo studies demonstrated that aldosterone regulates EC functions. In coronary ECs, aldosterone induces the expression of proinflammatory molecules as ICAM-1 and promotes leukocyte adhesion.²³ In human umbilical vein ECs, aldosterone modulates endothelial permeability and endothelial nitric oxide synthase activity.²⁴ We report in this paper that ECs are also sensitive to a low concentration of aldosterone in vivo and that they are targets of aldosterone in the heart. By activating ECs and promoting their proliferation, aldosterone may alter the finely tuned complex balance of interactions of ECs with their immediate environment and thus may sensitize the cardiac tissue to other triggers such as salt, oxidative stress, or increased blood pressure. Furthermore, the pathophysiological consequences of aldosterone-induced EC proliferation may depend on the environment. In rat, we showed that EC proliferation is increased after thoracic aortic constriction, an effect inhibited by MR blockade. Teekakirikul and

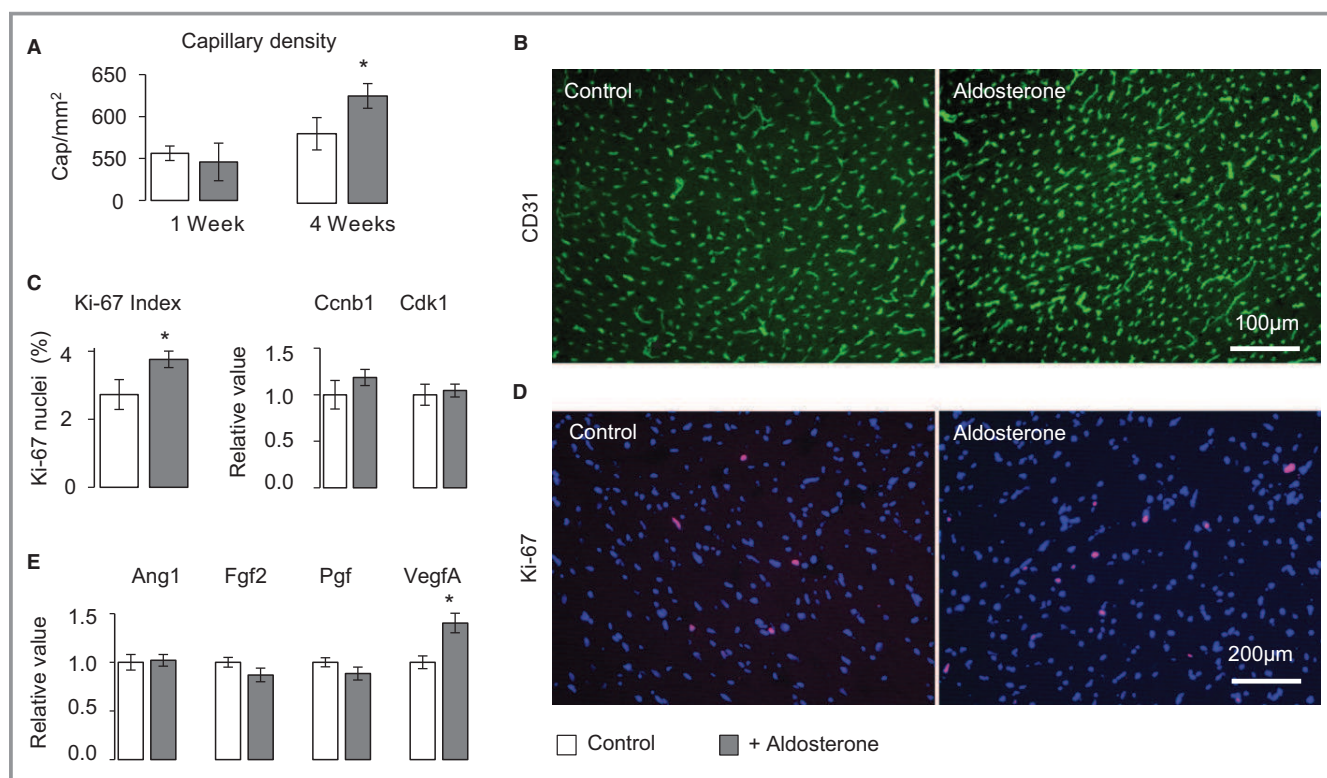


Figure 5. A, Capillary density. Aldosterone administration did not alter the number of capillaries after 1 week (control $n=6$ and aldosterone $n=9$) of treatment. Longer treatment (4 weeks; control $n=8$ and aldosterone $n=8$) increased capillary density by 7%. Statistical analysis was performed by Mann–Whitney test. Mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs corresponding controls. B, Immunolabeling of cardiac sections from untreated and aldosterone-treated mice following 4 weeks of treatment. Cardiac sections (4 μ m) were labeled with anti-CD31 antibody. C and D, Cardiac cell proliferation. C, Aldosterone induced an increase in cardiac Ki-67 index in mice after 4 weeks of treatment; however, cardiac expression of cyclin B1 (*Ccnb1*) and cyclin dependent kinase 1 (*Cdk1*) genes was not increased (control $n=8$ and aldosterone $n=8$). Statistical analysis was performed by Mann–Whitney test. Mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs controls. D, Ki-67 immunolabeling of cardiac sections (4 μ m) of untreated and aldosterone-treated mice (4 weeks). In blue, DAPI-stained nuclei; in red, Ki-67–positive nuclei. E, Change in transcript expression after 4 weeks aldosterone infusion. Among the proangiogenic factors tested at 1 week (*Ang1*, *Fgf2*, *Pgf*, and *VegfA*), only *VegfA* was increased after 4 weeks of aldosterone treatment (control $n=8$ and aldosterone $n=8$). Expression of these genes was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (normalized to 18S and ubiquitin C genes). Statistical analysis was performed by Mann–Whitney test. Mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs controls. *Ang1* indicates angiotensin II; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Pgf*, placental growth factor; Q-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; *Vegf-a*, vascular endothelial growth factor A.

collaborators showed that noncardiomyocyte cell proliferation is involved in the cardiac remodeling occurring in hypertrophic cardiomyopathy,²⁵ and although the authors did not address the question of the cell type that proliferates, they speculated on cardiac ECs undergoing endothelial-to-mesenchymal transformation, a recognized mechanism involved in cardiac fibrosis.²⁶ EC environment (healthy or pathological) may determine the fate of aldosterone-activated ECs into neocapillaries or fibroblasts. This hypothesis deserves consideration and needs further investigation.

The mechanisms underlying the proliferative effect of aldosterone on ECs have yet to be established. Aldosterone enhances the expression of proangiogenic factors such as VEGFA¹⁹ or placental growth factor, a member of VEGF family.²⁷ In our study, expression of *VegfA* and *Pgf* mRNA and of other proangiogenic factors (*Ang1* and *Fgf2*)²⁸ was not

altered after 1 week of treatment, whereas EC proliferation was clearly enhanced (although expression of *VegfA* was increased after 4 weeks, likely to consolidate the newly formed capillaries). This suggests that the primary trigger for aldosterone-induced EC proliferation may not be through proangiogenic growth factors. Direct activation of ECs should be considered. Indeed, aldosterone acts as a growth-promoting factor for different cell types (renal mesangial cells²⁹ but also vascular smooth muscle cells³⁰ and cardiac fibroblasts³¹) by promoting the activation of protein kinase signaling cascades.^{30,31} It is possible that aldosterone could directly induce EC proliferation in vivo. Stimulation of inflammation and oxidative stress, which are known to induce angiogenesis,³² is another mechanism that may be involved. Experimentally, the proliferation of vessels in a model of oxygen-induced retinopathy has been associated with the proinflam-

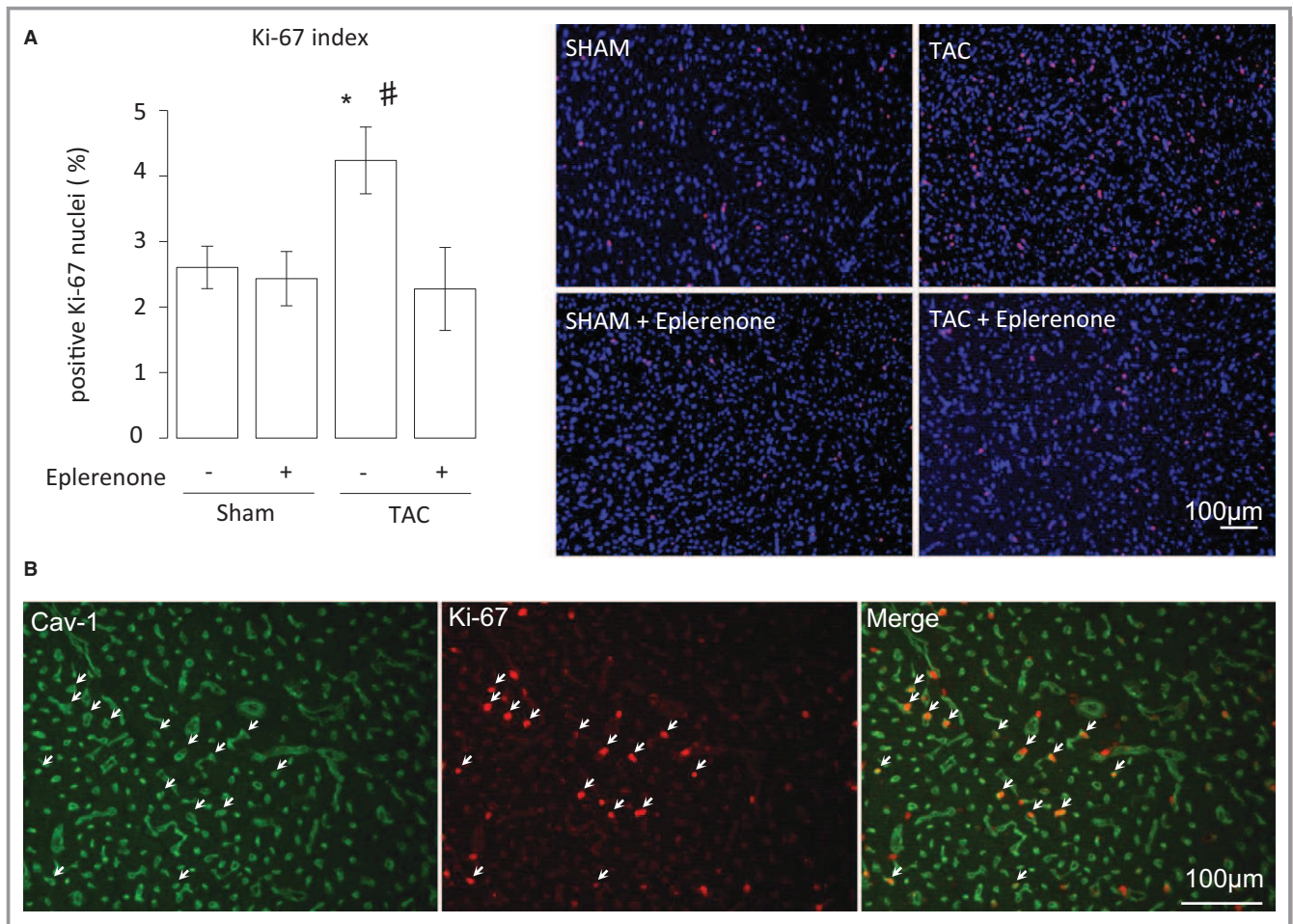


Figure 6. Cell proliferation in a model of heart failure. A, Ki-67 immunolabeling of cardiac sections (in blue, DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole]-stained nuclei; in red, Ki-67 positive nuclei). TAC induced an increase of Ki-67 index, an effect reversed by eplerenone (sham $n=5$, sham plus eplerenone $n=4$, TAC $n=5$, and TAC plus eplerenone $n=6$). Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis test. The Holm post hoc test was used to adjust for multiple comparisons. Mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs sham, # $P<0.05$ vs TAC plus eplerenone. B, Double immunolabeling of cardiac sections from rats with TAC. Cardiac sections were labeled with anti-Ki-67 and Cav-1. A very large fraction of Ki-67–positive nuclei colocalized within Cav-1 positive cells, indicating that most of the activated cells were endothelial cells. Cav-1 indicates caveolin 1; TAC, thoracic aortic constriction.

matory properties of aldosterone. In this model, TNF- α , MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 mRNA levels were increased in the retina.¹⁵ In our study, we did not find any effect of aldosterone on the expression of these molecules or pro-oxidative enzymes such as NADPH oxidase (data not shown). It is possible that aldosterone may activate distinct angiogenic pathways according to the vascular microenvironment. We propose that pathological situations may alter the balance between deleterious and beneficial actions of aldosterone, depending on the pathology and the target organ or tissue.

Angiogenesis is a beneficial process in cardiac hypertrophy and ischemic heart diseases.³³ In a transgenic model of cardiac hypertrophy, decrease in cardiac function was accompanied by impaired coronary angiogenesis.³⁴ Experimentally and clinically, MR antagonists have proven their efficacy in the

treatment of heart failure, whether of ischemic origin or not.³⁵ The beneficial effects of aldosterone blockade are multiple and include antifibrotic and antiarrhythmic properties. Consequently, it is likely that, in these pathological conditions, the deleterious effects of aldosterone overwhelm its positive effects, explaining the beneficial effects of aldosterone antagonists. This may not be the case in all pathological situations. We previously reported that the proangiogenic effects of aldosterone are beneficial in diabetic cardiomyopathy.²⁰ We demonstrated that a moderate increase of cardiac aldosterone (similar to what achieved in the present study) prevents the capillary rarefaction induced by diabetes, an effect blocked by the MR antagonist eplerenone. Spironolactone, another MR antagonist, has been reported to worsen endothelial function in type 2 diabetic patients.³⁶ It is possible that in some

pathological situations such as diabetes, such adverse effects of aldosterone antagonists (besides hyperkalemia) need to be taken into account. In contrast, aldosterone-driven angiogenesis may also be deleterious in pathologies such as cancer, in which angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis. Little is known about the involvement of MR and aldosterone in tumoral angiogenesis. In humans, aldosterone-producing adenoma vascularization is positively associated with aldosterone levels³⁷ whereas eplerenone attenuates hepatocellular carcinoma growth and angiogenesis in mice.³⁸ In contrast, in colorectal cancer, decrease in tumoral MR expression is associated with increased tumoral angiogenesis.³⁹ Further understanding of the role of aldosterone on cardiovascular homeostasis is required to identify potential adverse effects and new therapeutic potential of aldosterone antagonists to allow more efficient and safer use of these drugs.

This study demonstrates, for the first time, that aldosterone induces cardiac EC cycling in vivo in the heart of normal mice. These findings reveal new perspectives on the role played by aldosterone in cardiac physiology and pathology and highlight potential benefits and concerns with regard to pathologies in which beneficial or deleterious angiogenesis is involved.

Acknowledgments

We thank Prof Iris Z Jaffe (Molecular Cardiology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, MA) for valuable suggestions to the manuscript.

Sources of Funding

This work was supported by grants from INSERM (Institut National pour la Santé et Recherche Médicale), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR005-PCOD005 and ANR09-BLAN-0156-01), the European Union (FP7 funded Fibrotarget project SP7#602904) and the CRIT (Centre de Recherche Industrielle et Technique). Messaoudi received grants from the Region île de France (CODDIM) and Société Française d'Hypertension Artérielle (SFHTA).

Disclosures

None.

References

- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341:709–717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309–1321.
- Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011;364:11–21.
- Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. 1990;67:1355–1364.
- Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2002;161:1773–1781.
- Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J*. 2006;20:1546–1548.
- Perrier R, Richard S, Sainte-Marie Y, Rossier BC, Jaisser F, Hummler E, Benitah JP. A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac L-type Ca^{2+} current in mice. *J Physiol*. 2005;569:153–162.
- Gomez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, Pereira L, Zissimopoulos S, Zhu X, Schaub R, Perrier E, Perrier R, Latouche C, Richard S, Picot MC, Jaisser F, Lai FA, Valdivia HH, Benitah JP. Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins. *Circulation*. 2009;119:2179–2187.
- Milliez P, Gierard X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1243–1248.
- Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Launay JM, Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Clement K, Farman N, Jaisser F. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension*. 2013;61:361–367.
- Latouche C, Sainte-Marie Y, Steenman M, Castro Chaves P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Farman N, Jaisser F. Molecular signature of mineralocorticoid receptor signaling in cardiomyocytes: from cultured cells to mouse heart. *Endocrinology*. 2010;151:4467–4476.
- Prifti E, Zucker JD, Clement K, Henegar C. FunNet: an integrative tool for exploring transcriptional interactions. *Bioinformatics*. 2008;24:2636–2638.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710–1715.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997;106:348–360.
- Deliyanti D, Miller AG, Tan G, Binger KJ, Samson AL, Wilkinson-Berka JL. Neovascularization is attenuated with aldosterone synthase inhibition in rats with retinopathy. *Hypertension*. 2012;59:607–613.
- Thum T, Schmitter K, Fleissner F, Wiebking V, Dietrich B, Widder JD, Jazbutyte V, Hahner S, Ertl G, Bauersachs J. Impairment of endothelial progenitor cell function and vascularization capacity by aldosterone in mice and humans. *Eur Heart J*. 2011;32:1275–1286.
- Ladage D, Schutzeberg N, Dartsch T, Krausgrill B, Halbach M, Zobel C, Muller-Ehmsen J. Hyperaldosteronism is associated with a decrease in number and altered growth factor expression of endothelial progenitor cells in rats. *Int J Cardiol*. 2011;149:152–156.
- Wu VC, Lo SC, Chen YL, Huang PH, Tsai CT, Liang CJ, Kuo CC, Kuo YS, Lee BC, Wu EL, Lin YH, Sun YY, Lin SL, Chen JW, Lin SJ, Wu KD. Endothelial progenitor cells in primary aldosteronism: a biomarker of severity for aldosterone vasculopathy and prognosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:3175–3183.
- Michel F, Ambroisine ML, Duriez M, Delcayre C, Levy BI, Silvestre JS. Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway. *Circulation*. 2004;109:1933–1937.
- Messaoudi S, Milliez P, Samuel J, Delcayre C. Cardiac aldosterone overexpression prevents harmful effects of diabetes in the mouse heart by preserving capillary density. *FASEB J*. 2009;23:2176–2185.
- Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Miller AG. Identification of a retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. *Circ Res*. 2009;104:124–133.
- Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev*. 2003;83:59–115.
- Caprio M, Newell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ Res*. 2008;102:1359–1367.

24. Kirsch T, Beese M, Wyss K, Klinge U, Haller H, Haubitz M, Fiebeler A. Aldosterone modulates endothelial permeability and endothelial nitric oxide synthase activity by rearrangement of the actin cytoskeleton. *Hypertension*. 2013;61:501–508.
25. Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, Nayor M, Konno T, Gorham JM, Wolf CM, Kim JB, Schmitt JP, Molkentin JD, Norris RA, Tager AM, Hoffman SR, Markwald RR, Seidman CE, Seidman JG. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest*. 2010;120:3520–3529.
26. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*. 2007;13:952–961.
27. Jaffe IZ, Newell BG, Aronovitz M, Mohammad NN, McGraw AP, Perreault RE, Carmeliet P, Ehsan A, Mendelsohn ME. Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:3891–3900.
28. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C947–C970.
29. Nishiyama A, Yao L, Fan Y, Kyaw M, Kataoka N, Hashimoto K, Nagai Y, Nakamura E, Yoshizumi M, Shokoji T, Kimura S, Kiyomoto H, Tsujioka K, Kohno M, Tamaki T, Kajiya F, Abe Y. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension*. 2005;45:710–716.
30. Ishizawa K, Izawa Y, Ito H, Miki C, Miyata K, Fujita Y, Kanematsu Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Nishiyama A, Yoshizumi M. Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. *Hypertension*. 2005;46:1046–1052.
31. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H176–H184.
32. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91:323–328.
33. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res*. 2014;114:565–571.
34. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*. 2005;115:2108–2118.
35. Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C, Jaisser F. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;350:266–272.
36. Davies JJ, Band M, Morris A, Struthers AD. Spironolactone impairs endothelial function and heart rate variability in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47:1687–1694.
37. Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iaconi P, Miccoli P, Salvetti A. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:4961–4965.
38. Kaji K, Yoshiji H, Kitade M, Ikenaka Y, Noguchi R, Shirai Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Selective aldosterone blocker, eplerenone, attenuates hepatocellular carcinoma growth and angiogenesis in mice. *Hepatol Res*. 2010;40:540–549.
39. Tiberio L, Nascimbeni R, Villanacci V, Casella C, Fra A, Vezzoli V, Furlan L, Meyer G, Parrinello G, Baroni MD, Salerni B, Schiaffonati L. The decrease of mineralocorticoid receptor drives angiogenic pathways in colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8:e59410.

3.2.2.4 Conclusions de l'étude et discussion

Cette étude a permis de montrer qu'une augmentation (même modeste) de la concentration plasmatique en aldostérone permet :

- l'induction dans le cœur de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire
- l'induction de la prolifération des cellules endothéliales cardiaques.

Des études ont montré auparavant un effet de l'aldostérone sur la prolifération des cellules endothéliales, soit activateur, soit inhibiteur. Chez le rat, une infusion d'aldostérone diminue le nombre de cellules progénitrices des cellules endothéliales (dérivées de la moelle osseuse), et cet effet est bloqué par la spironolactone²²¹. Chez l'homme, les patients atteints d'hyperaldostéronisme primaire possèdent un taux circulant de cellules progénitrices des cellules endothéliales plus faible que celui des patients atteints d'hypertension, et qui est inversement corrélé à l'aldostéronémie²²². L'ablation d'une des glandes surrénales, ou un traitement à la spironolactone, induisent une augmentation de ces cellules progénitrices dans la circulation chez ces mêmes patients²²². *In vitro*, l'aldostérone induit la prolifération de cellules endothéliales de rétine bovine²²³. Ces effets opposés de l'aldostérone peuvent s'expliquer par la concentration d'aldostérone utilisée. En effet, dans les cellules endothéliales de rétine bovine, 10^{-9} M d'aldostérone entraîne leur prolifération et la formation de tubules, premier stade de la création de nouveaux vaisseaux. Au contraire, la diminution du nombre de cellules progénitrices des cellules endothéliales observée chez les patients atteints d'hyperaldostéronisme primaire (l'aldostéronémie pouvant atteindre 10^{-8} M) est également montrée dans les cellules endothéliales de rétine bovine à des doses d'aldostérone bien supérieures aux doses physiologiques (10^{-5} M - 10^{-6} M)²²². Il semble donc qu'à des concentrations physiologiques *in vivo*, l'aldostérone peut induire la prolifération des cellules endothéliales, comme ce que nous avons observé dans notre étude.

Les mécanismes impliqués dans l'induction par l'aldostérone de la prolifération des cellules endothéliales cardiaques restent à établir. En effet, nos résultats montrent que la protéine pro-angiogénique VEGF-a (création de nouveaux vaisseaux sanguins) est augmentée dans le cœur des souris après 4 semaines de traitement à l'aldostérone, tandis que la prolifération des cellules endothéliales est observée dès 1 semaine. Sur un modèle d'ischémie de souris (au niveau de la patte droite), l'aldostérone augmente simultanément la néo-vascularisation de la patte et VEGF-a²²⁴. Le facteur de croissance placentaire, autre facteur pro-angiogénique induit par l'aldostérone dans des aortes de souris *ex-vivo*²²⁵, n'est cependant

pas augmenté dans le cœur des souris traitées 1 à 4 semaines à l'aldostérone. Nos résultats suggèrent donc que les facteurs pro-angiogéniques ne sont pas les premiers mécanismes mis en place au cours de la prolifération des cellules endothéliales, induite par l'aldostérone. Il est possible que la prolifération endothéliale soit activée directement par l'aldostérone. En effet l'aldostérone est connue pour activer certaines MAP kinases, comme ERK1/2 (*confer* chapitre 1.4.1), elles-mêmes impliquées dans les phénomènes de croissance et de prolifération cellulaires¹¹⁸. Dans d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes cardiaques²²⁶ ou les cellules musculaires lisses vasculaires de rat²²⁷, l'aldostérone augmente l'activité des MAP kinases. L'ensemble de ces observations suggèrent que dans nos expériences, l'aldostérone pourrait directement induire *in vivo* la prolifération des cellules endothéliales cardiaques.

3.2.2.5 Implication du RM dans la prolifération des cellules endothéliales cardiaques induite par l'aldostérone

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la prolifération des cellules endothéliales cardiaques induite par l'aldostérone ni les conséquences physiopathologiques potentielles. Nous avons cependant tiré profit du modèle de souris transgénique RM-Cardio, pour analyser l'effet potentiel du RM dans ce processus biologique. Les résultats présentés dans cette partie ont été effectués avec le Docteur Messaoudi.

Les souris RM-Cardio présentent à l'état de base une augmentation de l'index de prolifération Ki-67 dans le cœur par rapport aux souris contrôles. L'aldostérone potentialise cet effet (Figure 13).

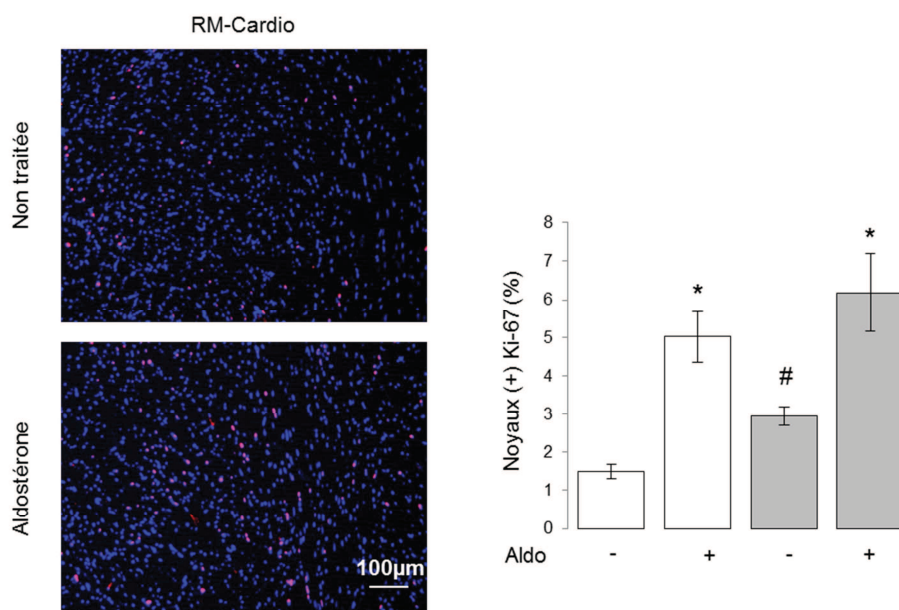


Figure 13. Immunolocalisation et quantification de Ki-67 sur des coupes de cœur de souris RM-Cardio traitées ou non à l'aldostérone. Les barres vides représentent les souris contrôles, les barres grises représentent les souris RM-Cardio. Echelle : 100 µm; * $p < 0,05$ vs non traitées ; # $p < 0,05$ vs Ctrl correspondantes.

Nous avons ensuite cherché à identifier le type cellulaire capable de proliférer dans ce tissu. Les souris RM-Cardio traitées à l'aldostérone présentent une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales cardiaques (Figure 14). En parallèle, les gènes impliqués dans le cycle cellulaire Cdk1 et Ccnb1 augmentent avec le traitement à l'aldostérone (Figure 15).

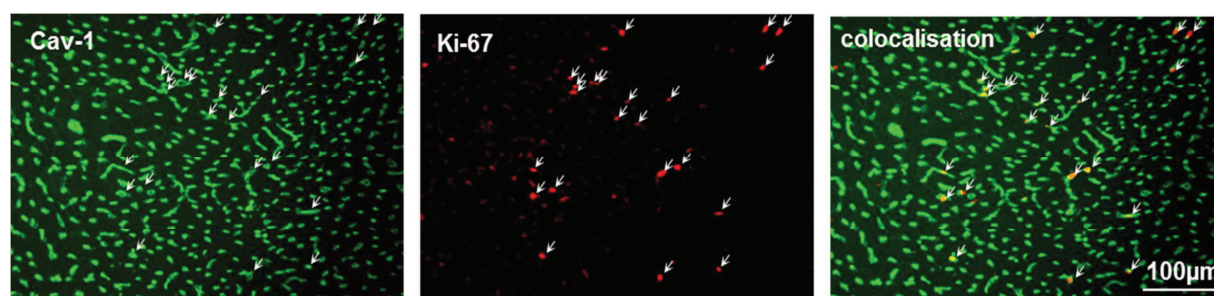


Figure 14. Immunolocalisation de la cavéoline-1 et du Ki-67 dans des coupes de cœur de souris RM-Cardio traitées à l'aldostérone. La colocalisation des deux marquages montre que les cellules en prolifération sont les cellules endothéliales du cœur. Echelle : 100 µm; Cav-1 : cavéoline-1.

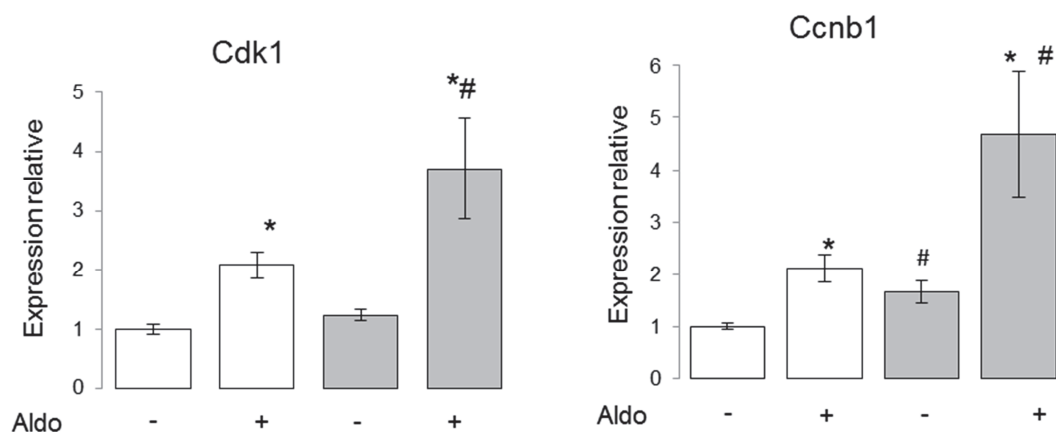


Figure 15. Expression cardiaque des gènes codant pour la cycline B1 et la Cdk1. Les expressions des gènes Ccnb1 et Cdk1 induites par l'aldostérone sont plus importantes chez les RM-Cardio par rapport à leurs contrôles. A l'état basal, l'expression de Ccnb1 est augmentée chez les RM-Cardio par rapport à leurs souris contrôles. Ccnb1 : Cycline B1, Cdk1 : Cyclin-dependent kinase, Aldo : aldostérone. * $p < 0,05$ vs non traitée ; # $p < 0,05$ vs Ctrl correspondante.

De façon intéressante, la prolifération des cellules endothéliales cardiaques et l'expression cardiaque de Ccnb1 sont plus fortes chez les souris RM-Cardio non traitées que chez les souris contrôles. Nos résultats suggèrent donc que la surexpression du RM dans les cardiomyocytes induit la prolifération des cellules endothéliales cardiaques. Etant exprimé en plus grand nombre, le RM induirait une expression quantitativement plus importante de ses cibles et pourrait amplifier l'augmentation de la prolifération des cellules endothéliales qui est activée par l'aldostérone endogène.

L'infusion d'aldostérone n'entraîne pas une augmentation plus forte de l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 chez les souris RM-Cardio par rapport aux souris contrôles traitées, bien qu'elle potentialise l'augmentation de Cdk1 et Ccnb1. Certaines cibles apparaissent donc moins sensibles que d'autres au nombre de complexe aldostérone/RM formé. Néanmoins, il semble que le RM du cardiomyocyte puisse médier, au moins en partie, l'effet de l'aldostérone sur la prolifération des cellules endothéliales cardiaques et sur l'expression cardiaque de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Il est également possible que l'aldostérone induise les effets que nous observons en agissant au niveau du vaisseau *via* son récepteur exprimé dans les cellules endothéliales cardiaques mais aussi dans les cellules musculaires lisses vasculaires. En effet, une étude a démontré que l'aldostérone induit *in vivo* la prolifération des cellules musculaires lisses dans des carotides de souris, et cet effet passe

par l'augmentation d'expression du récepteur au VEGF-a, *via* le RM des cellules musculaires lisses²²⁸.

Pour identifier si l'augmentation de prolifération des cellules endothéliales cardiaques permet la création de nouveaux vaisseaux chez les souris RM-Cardio, une étude préliminaire de notre laboratoire a analysé la densité capillaire cardiaque chez les souris RM-Cardio traitées ou non à l'aldostérone, comparée à leurs souris contrôles. Nous avons observé une diminution de la densité capillaire chez les souris RM-Cardio, indépendamment du traitement. Chez ces souris, la prolifération des cellules endothéliales cardiaques est associée à une diminution du nombre de capillaires. Ces observations, bien que contradictoires, peuvent être rapprochées à un travail collaboratif du laboratoire montrant que ces mêmes souris présentent une sévère dysfonction de la réponse de relaxation dépendante du monoxyde d'azote dans les artères coronaires¹⁷⁵. Cette réponse est bloquée par l'ajout de canrénoate de potassium ou de vitamine E et vitamine C (cocktail vitaminique inhibant la voie du stress oxydatif et plus particulièrement la peroxydation des lipides et les espèces réactives de l'oxygène). Par ailleurs, il a été montré que le stress oxydatif et l'inflammation induisent l'angiogenèse *in vivo*²²⁹. Dans un modèle de rétinopathie chez la souris, l'expression des gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires comme MCP1 ou VCAM-1 est augmentée par rapport aux souris contrôles²³⁰. Un inhibiteur de l'aldostérone synthase prévient leurs augmentations, suggérant que l'aldostérone, *via* les voies inflammatoires et de stress oxydatif, peut stimuler la néovascularisation caractéristique des rétinopathies diabétiques. Il semble donc que la surexpression du RMh dans le cardiomyocyte induise un effet délétère sur les vaisseaux cardiaques, *via* le stress oxydatif. Ces souris pourraient s'adapter en augmentant leur nombre de cellules endothéliales cardiaques, sans pour autant entraîner la création de nouveaux vaisseaux. Toutefois, il est possible que le RM et l'aldostérone augmentent la prolifération des cellules endothéliales cardiaques et l'angiogenèse chez les souris RM-Cardio mais que d'autres voies prépondérantes ne permettent pas de mettre en évidence ces mécanismes.

En conclusion, notre étude montre que l'aldostérone peut induire, à travers l'augmentation de la prolifération des cellules endothéliales cardiaques, des effets n'étant pas nécessairement impliqués dans des processus délétères. La situation pathologique et le tissu considéré apparaissent être des facteurs impliqués dans la balance des effets opposés (bénéfiques contre délétères) de l'aldostérone.

3.2.3 Implications des microARNs dans la voie de signalisation du RM cardiaque

3.2.3.1 Etat de la question

Les microARNs, non-codants, sont des ARNs simples brins d'une vingtaine d'oligonucléotides qui se lient aux ARNm et empêchent leur traduction en protéines (modulations post-transcriptionnelles; Figure 16).

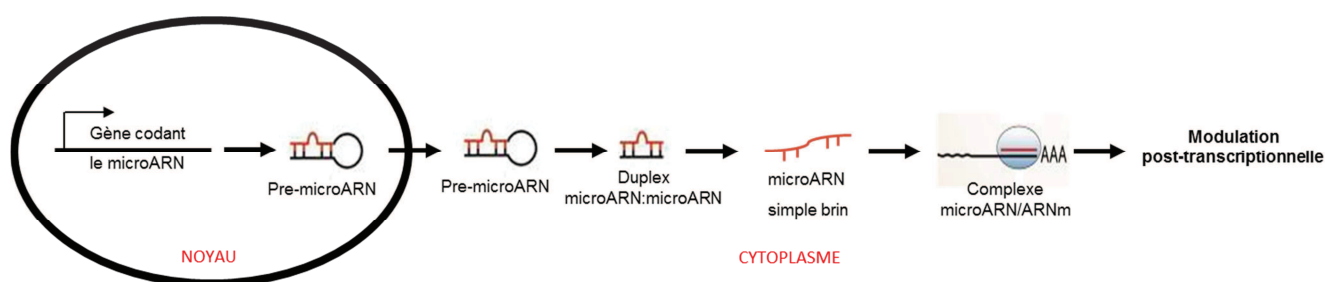


Figure 16. Schéma représentant le mode d'action du microARN. Le précurseur du microARN, le pre-microARN va être clivé par l'enzyme Dicer au niveau de sa boucle pour donner un duplex double brin microARN: microARN dans le cytoplasme. Ce duplex va donner ensuite un microARN simple brin qui va s'associer à des protéines chaperonnes pour former le complexe RISC (pour *RNA-induced silencing complex*). Ce complexe va reconnaître spécifiquement un ARNm cible et permettre soit sa dégradation, soit l'inhibition de sa traduction. ARN: acide ribonucléique; ARNm: acide ribonucléique messager.

Notre étude a cherché à identifier dans le cœur des microARNs spécifiquement régulés par le RM, et a été effectuée en collaboration avec un laboratoire spécialisé dans l'analyse transcriptomique, dirigé par le Docteur Laurent Vallar (Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg).

3.2.3.2 Objectif de l'étude

Le but du travail a été de mettre en évidence un ou plusieurs microARNs modulés par le RM dans le cœur et de comprendre leurs conséquences physiologiques et physiopathologiques. Pour cela, nous avons analysé l'ensemble des microARNs transcrits

dans le cœur des souris RM-Cardio non traitées et de leurs contrôles, par puces à oligonucléotides.

3.2.3.3 Comparaison du miRnome des souris RM-Cardio par rapport à celui de leurs contrôles

L'analyse des deux miRnoms a montré que 293 microARNs sont différemment exprimés entre les souris RM-Cardio et leurs contrôles. Seuls trois sont statistiquement surexprimés dans le cœur des souris RM-Cardio (Figure 17), de nomenclature miR-1941-5p, miR-215 et miR-298. Notre étude s'est focalisée sur le miR1941-5p, étant le plus modulé par la surexpression du RM dans le cœur.

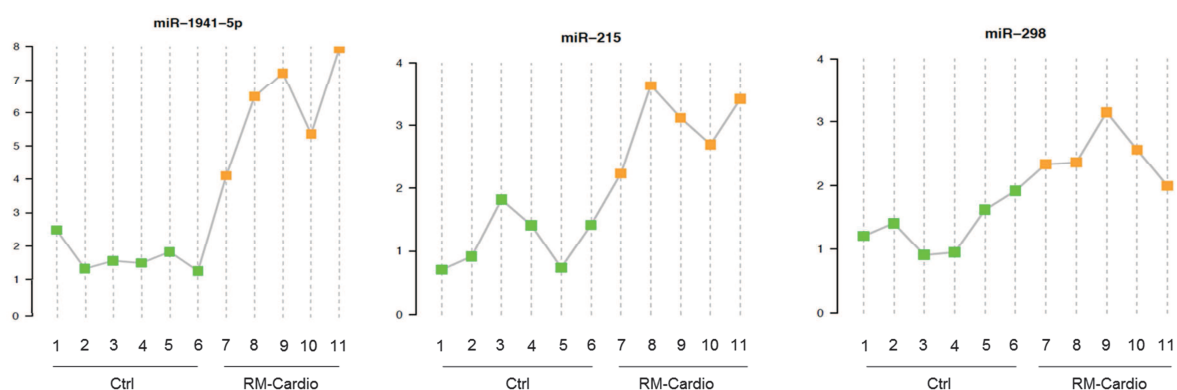


Figure 17. Les microARNs 1941-5p, 215 et 298 sont les seuls microARNs surexprimés dans le cœur des souris RM-Cardio. miR : microARNs; RM-Cardio : souris non traitées surexprimant spécifiquement le RMh dans les cardiomyocytes; Ctrl : souris contrôles correspondantes.

3.2.3.4 Pertinence physiopathologique de la modulation du miR-1941-5p par le RM cardiaque

La première étape a consisté à vérifier que le miR-1941-5p est augmenté *in vivo* dans les cœurs de souris RM-Cardio par rapport à leurs contrôles. L'expression relative de celui-ci est environ 15 fois plus importante dans le cœur des souris RM-cardio comparée aux contrôles. Il est à noter que dans les souris contrôles, l'expression de ce microARN est pratiquement nulle, l'expression relative ne reflétant donc pas l'expression réelle du miR-1941-5p dans le cœur des souris RM-Cardio. Cela signifie donc que le miR-1941-5p est

exprimé dans le cœur quand la voie de signalisation minéralocorticoïde est activée par la surexpression du RM et suggère que la modulation de l'expression du miR-1941-5p intervient spécifiquement dans un environnement pathologique particulier. Une telle modulation de gènes peut également être retrouvée dans d'autres conditions. Nous avons montré par exemple que l'expression du gène codant pour l'*Orosomucoid-1* est également très faible dans les cellules H9C2-RM⁺ et l'ajout d'aldostérone l'augmente de plus de 1000 fois (*confer* chapitre 3.1.1).

Nous avons observé que le miR-1941-5p n'est pas induit dans le cœur des souris transgéniques surexprimant spécifiquement le RG dans les cardiomyocytes (RG-Cardio), indiquant que le miR-1941-5p est spécifiquement régulé par le RM dans le cœur (Figure 18).

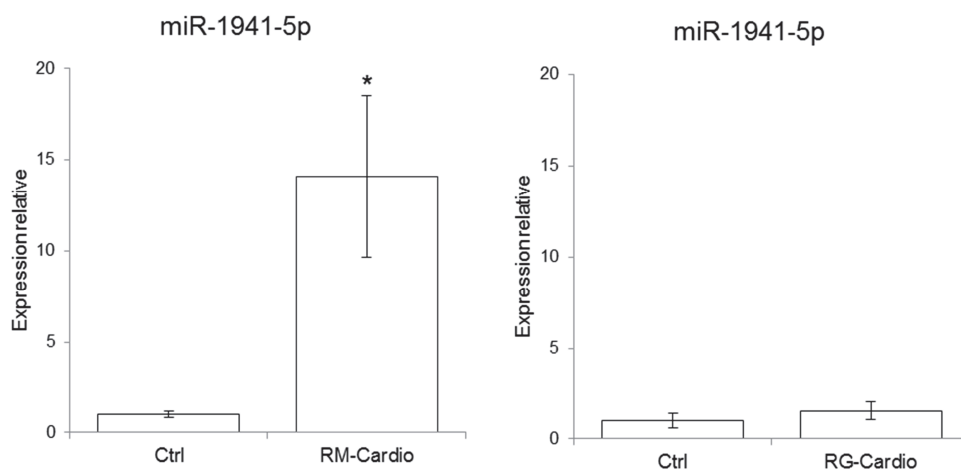


Figure 18. Modulation de l'expression du miR-1941-5p dans le cœur de souris surexprimant dans le cardiomyocyte le RM ou le RG. RM-Cardio : souris non traitées surexprimant spécifiquement le RMh dans les cardiomyocytes; RG-Cardio: souris non traitées surexprimant spécifiquement le RG dans les cardiomyocytes; Ctrl: souris contrôles correspondantes. * $p < 0,05$ vs Ctrl.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la pertinence physiopathologique de la surexpression du miR-1941-5p dans le cœur. Nous n'avons pas observé d'augmentation d'expression du miR-1941-5p dans le cœur de souris soumises à une infusion d'aldostérone seule ou soumises au modèle NAS (Figure 19).

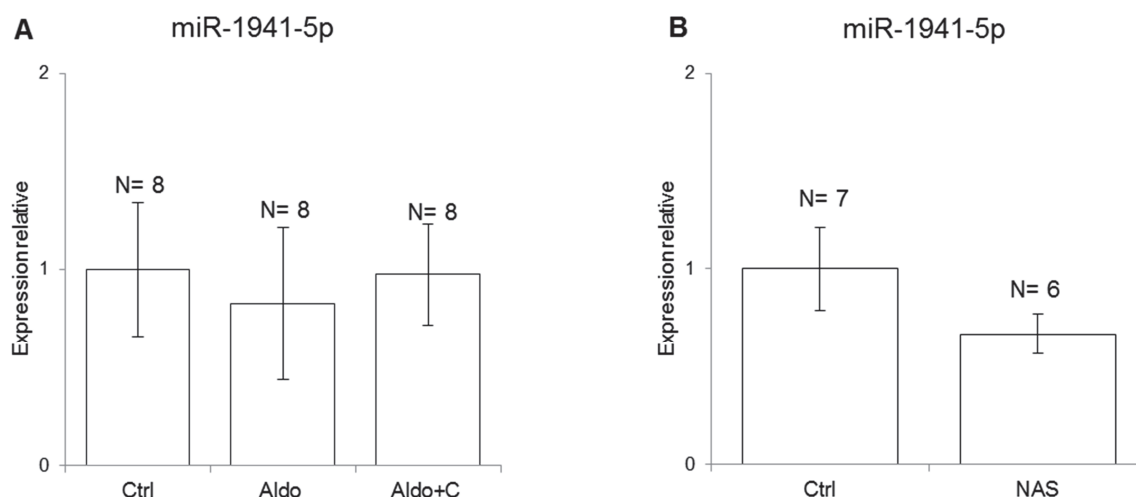


Figure 19. Effet de modèles d'activation minéralocorticoïde sur l'expression cardiaque du miR-1941-5p. **A** : Effet de l'infusion d'aldostérone sur l'expression du miR-1941-5p dans le cœur de souris C57BL/6JRj. Ctrl : souris contrôles non traitées; Aldo : souris traitées à l'aldostérone; Aldo+C : souris traitées à l'aldostérone et au canrénoate de potassium. **B** : Effet du modèle NAS sur l'expression du miR-1941-5p dans le cœur de souris C57BL/6JRj; Ctrl: souris contrôles non traitées; NAS : souris soumises au modèle NAS.

3.2.3.5 Conclusions de l'étude et discussion

Cette étude a montré que le RM module spécifiquement certains microARNs au niveau cardiaque comme le miR-1941-5p.

Les microARNs sont impliqués dans des phénomènes biologiques très divers^{231, 232}. A ce jour, il a été identifié dans le cœur plus de 200 microARNs matures. Du fait de leurs rôles en physiologie, leurs dérégulations sont souvent observées dans des pathologies comme les cancers ou les pathologies cardiovasculaires²³³. Le miR-21 est par exemple surexprimé dans un modèle d'hypertrophie cardiaque chez la souris et dans des cultures de cardiomyocytes de rats nouveau-nés traitées à l'angiotensine II²³⁴. Au contraire, le modèle d'insuffisance cardiaque chez des rats ayant subi une sténose de l'aorte montre une diminution du miR-133 par rapport aux rats contrôles²³⁵. Les modulations de l'expression des microARNs dans ces nombreux modèles expérimentaux démontrent l'importance de ceux-ci en pathologies cardiovasculaires. Ils sont aujourd'hui des cibles privilégiées de nouvelles stratégies thérapeutiques, permettant leur surexpression ou leur inhibition²³⁶. Cependant, les microARNs ne sont pas encore utilisés en clinique en raison du grand nombre d'ARNm dont

ils régulent l'expression, du grand nombre de protéines qu'ils modulent et des différents tissus dans lesquels ils agissent.

Les connaissances sur le miR-1941-5p restent très peu documentées. Nous avons pu montrer que l'expression du miR-1941-5p est spécifiquement dépendante du RM et non du RG. Au contraire l'expression du miR-215 est environ 2 fois plus importante chez les souris RM-Cardio et RG-Cardio, par rapport aux souris contrôles correspondantes (données non présentées). Nous avons tenté d'appréhender la pertinence physiopathologique de cette surexpression en étudiant la modulation de son expression chez des souris soumises à une infusion d'aldostérone seule ou soumises au modèle NAS. Aucune modification de l'expression du miR-1941-5p n'a cependant été observée.

Les cibles potentielles du miR-1941-5p, identifiées in-silico par alignement de séquence, sont disponibles sur une base de données en ligne. Environ 110 ont été répertoriées, et la majorité est représentée par des gènes codant pour des protocadhérines de type α . Ces protéines transmembranaires, faisant partie de la superfamille des cadhérines, permettent l'adhérence et la connexion des neurones entre eux. Nous avons croisé le transcriptome cardiaque des souris RM-Cardio avec cette liste des cibles potentielles du miR-1941-5p. Aucun gène dont l'expression est diminuée chez ces souris (par rapport à leurs souris contrôles) n'a cependant été identifié dans la liste des cibles potentielles du miR-1941-5p. Ces observations ne nous ont donc pas permis d'analyser plus avant l'implication du miR-1941-5p dans la voie de signalisation minéralocorticoïde au niveau du cœur. L'étude comparée des miRnoms cardiaques des souris RM-Cardio non traitées et traitées à l'aldostérone pourrait nous permettre d'approfondir les mécanismes de modulation du miR-1941-5p.

Ces travaux soulèvent deux questions majeures. Premièrement, le miRnome réalisé sur le cœur entier de souris, ne permet pas d'identifier spécifiquement la cellule (ou les cellules) où le miR-1941-5p s'exprime. Deuxièmement, la fonction de ce microARN dans les effets de l'aldostérone reste à identifier.

PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE

Mon travail de thèse a consisté à étudier les différentes cibles moléculaires susceptibles d'être régulées par le RM dans le cœur, afin de mieux appréhender l'implication de ce récepteur dans les pathologies cardiovasculaires. La première partie de ma thèse a concerné l'action du torasémide sur la voie de signalisation minéralocorticoïde cardiaque. La seconde partie de ma thèse s'est adressée à l'étude des gènes codants ou non-codants pouvant être des cibles dépendantes du complexe aldostérone/RM dans le cœur, et plus particulièrement dans le cardiomyocyte.

4.1 Comparaison entre torasémide et spironolactone

Dans la première partie de cette thèse, nous avons utilisé la spironolactone, antagoniste bien connu du RM, pour comparer ses effets sur l'activité transcriptionnelle du récepteur par rapport à ceux du torasémide. Cependant, la spironolactone n'agit pas comme un antagoniste compétitif classique du RM.

Il a été montré que la spironolactone et l'aldostérone partagent un site commun de liaison au niveau du DLL du RM. La spironolactone peut donc agir comme un antagoniste compétitif en empêchant la liaison entre l'aldostérone et le RM²³⁷. Par ailleurs, le groupe de Bonvalet *et al.* a montré que la spironolactone marquée au tritium se retrouve dans le noyau de cellules du canal collecteur de lapin²³⁸. En se liant au DLL, particulièrement dans la région située entre les acides aminés 804 et 874, la spironolactone induit un changement de conformation du RM²³⁹. Cette action permet de démasquer un SLN entraînant la translocation nucléaire du RM, sans pour autant induire son activité transcriptionnelle. Nos travaux sont en accord avec ces précédentes observations où la spironolactone seule, en absence de ligand, permet la translocation nucléaire du RM au cours du temps. Toutefois, cette translocation est moins rapide qu'avec l'aldostérone ou la co-administration d'aldostérone et de torasémide. Ce changement de conformation tridimensionnelle induit par la spironolactone modifie les interactions entre le RM et ses corégulateurs transcriptionnels mais également avec ses protéines chaperones cytoplasmiques (modulant la voie de signalisation minéralocorticoïde), comme le montre la dissociation entre HSP90 et le RM^{237, 240}. Une étude chez le rat sur un modèle d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé a montré que la spironolactone, en absence de

ligand exogène, est capable de diminuer la taille de l'infarctus²⁴¹. Par conséquent, les auteurs ont proposé que la spironolactone ait certains effets, *via* le RM, opposés à ceux de l'aldostérone. Ces propriétés sont cohérentes avec les modifications dans le recrutement des partenaires du RM induites par le changement de conformation du récepteur après la liaison avec la spironolactone. Cependant, il n'est toujours pas connu si l'effet agoniste partiel supposé, de la spironolactone sur le RM, module un réseau de gènes dépendant de la voie minéralocorticoïde ou d'une voie de signalisation alternative.

4.2 Cibles moléculaires du RM dans le cœur

4.2.1 CTGF

L'étude de ce gène candidat a permis de mieux appréhender la question de la sélectivité du ligand pour le RM au niveau du cardiomyocyte, dans la mesure où CTGF est modulé par l'aldostérone et par son récepteur dans ce type cellulaire, malgré l'absence de 11 β -HSD2 et la présence de glucocorticoïdes en forte concentration. Le niveau d'expression du RM est également un facteur important à prendre en compte.

Nos travaux ont montré qu'une expression 10 fois plus forte du RM (en moyenne) dans le cœur de souris module l'expression de 865 gènes. La voie minéralocorticoïde dans le cœur apparaît donc suractivée en présence d'une expression plus importante de RM dans le cardiomyocyte, alors que l'aldostéronémie est normale. Ainsi, une concentration plasmatique physiologique d'aldostérone est capable d'induire la voie de signalisation minéralocorticoïde, comme les modèles expérimentaux de surcharge minéralocorticoïde (modèle NAS ou DOCA-Sel par exemple).

Les variations de concentration plasmatique en aldostérone et en glucocorticoïdes sont également à discuter. Une étude prédictive chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque de stade III ou IV indique que les patients ayant la concentration plasmatique en corticostéroïdes la plus élevée ont un risque de mortalité 3,4 fois plus élevé que ceux ayant des concentrations plasmatiques sous la valeur médiane²⁴². Nous avons mis en évidence la capacité de la corticostérone, comme l'aldostérone, à moduler l'expression de certains gènes *via* le RM comme par exemple la peptidase avec motifs thrombospondines de type 4 (Adamts4, pour *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4*) et le canal perméable au calcium Trpc4 pour *transient receptor potential cation channel, subfamily*

C, member 4. La corticostérone diminue l'expression d'Adamts4 dans le cœur des souris RM-Cardio alors qu'elle potentialise l'augmentation de l'expression de Trpc4 induite par le RM. Le RM semble donc pouvoir réguler différemment la même cible selon le ligand activateur. En effet, l'expression d'Adamts4 est diminuée par la corticostérone mais augmentée par l'aldostérone chez les souris RM-Cardio. Le RM peut également réguler la même cible de la même manière avec ses deux ligands (comme le montre l'exemple de Trpc4).

4.2.2 Aldostérone et prolifération

Nous avons montré que l'aldostérone induit la prolifération des cellules endothéliales cardiaques. Les cellules endothéliales peuvent réguler différentes fonctions impliquées dans la physiologie cardiaque, comme la perméabilité vasculaire, la régulation du diamètre des vaisseaux sanguins en réponse à la pression ou aux stimulations hormonales, le recrutement et l'adhérence à l'endothélium des cellules de l'immunité, ainsi que la coagulation sanguine²⁴³. Deux types majeurs de cellules endothéliales sont présents dans le cœur; les cellules endothéliales coronariennes contrôlant la vascularisation de la totalité de l'organe, et les cellules endothéliales des capillaires, à proximité des cardiomyocytes, participant aux effets paracrines entre cellules adjacentes. Dans nos travaux, l'index de prolifération Ki-67 est localisé dans les cellules endothéliales coronariennes et capillaires.

Les cellules endothéliales expriment le RM et l'enzyme 11 β -HSD2 et sont les cibles des effets de l'aldostérone²⁴⁴. L'aldostérone est capable, *in vitro*, de réguler certaines fonctions endothéliales. Dans une culture primaire de cellules endothéliales humaines provenant d'artères coronaires, l'aldostérone induit l'expression de la molécule d'adhérence intercellulaire de type 1 (ICAM-1, pour *intercellular adhesion molecule-1*)¹⁴⁸. Cette protéine intervient dans l'adhérence des cellules mononuclées du sang aux cellules endothéliales (ces dernières étant activées par des cytokines inflammatoires ou le stress oxydatif) et ainsi permettre leur infiltration dans les tissus lésés²⁴⁵. L'ajout de spironolactone aux cellules endothéliales humaines coronariennes prévient l'augmentation d'ICAM-1 ainsi que l'adhérence et l'infiltration des monocytes, suggérant qu'ICAM-1 est une cible directe du complexe aldostérone/RM¹⁴⁸. De plus, une concentration de 10⁻⁹ M d'aldostérone altère la perméabilité de cellules endothéliales humaines issues de veine ombilicale (HUVEC, pour *human umbilical vein endothelial cells*) en induisant une réorganisation du cytosquelette d'actine et des jonctions serrées²⁴⁶. L'aldostérone diminue également la production de

monoxyde d'azote par les HUVEC²⁴⁶. Nous avons montré ici que la prolifération des cellules endothéliales cardiaques est induite par l'aldostérone *in vivo*. Cette étude n'a cependant pas permis d'identifier si cette prolifération est liée à des altérations d'interactions des cellules endothéliales cardiaques avec leur environnement.

Un modèle physiopathologique d'insuffisance cardiaque par sténose de l'aorte chez le rat nous a permis de montrer que ceux-ci présentent une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales cardiaques. Cet effet passe par la voie de signalisation minéralocorticoïde car l'éplérénone bloque cette augmentation. D'autres travaux suggèrent que la prolifération des cellules endothéliales cardiaques est impliquée en physiopathologie cardiaque. Ainsi, le remodelage cardiaque induit par un modèle de cardiomyopathie hypertrophique chez la souris stimule la prolifération de cellules cardiaques, distinctes des cardiomyocytes²⁴⁷. Cette étude suggère que ces cellules prolifératives vont dériver en fibroblastes selon un processus de transition endothélio-mésenchymateuse, mécanisme reconnu dans la mise en place de la fibrose cardiaque²⁴⁸. Par conséquent, cette transition endothélio-mésenchymateuse semble être favorisée lors du développement de pathologies cardiaques. Il est à noter que l'effet pro-angiogénique de l'aldostérone rapporté dans notre étude pourrait également être observé dans le cœur sain. En conséquence, selon le milieu environnant, l'activation du complexe aldostérone/RM peut avoir des effets bénéfiques sur le cœur, en créant de nouveaux vaisseaux par exemple.

Le complexe aldostérone/RM est impliqué dans de nombreux processus délétères au niveau cardiaque comme la mise en place de fibrose, d'hypertrophie ou de troubles du rythme. Comme cela a été montré dans des études cliniques telles que RALES, le blocage du RM prévient la mise en place de ces différents processus. Cependant, les antagonistes bloquent tous les effets de l'aldostérone, délétères et potentiellement bénéfiques (comme la néo-angiogénèse). Le blocage du RM pourrait donc ne pas représenter la thérapeutique la plus appropriée dans certaines situations pathologiques. Les souris surexprimant l'aldostérone synthase spécifiquement dans les cardiomyocytes sont quant à elles protégées de la diminution de la densité capillaire lors de l'induction expérimentale d'un diabète de type 1¹⁷⁴. L'ajout d'éplérénone prévient cet effet bénéfique sur la densité capillaire et peut donc être considéré comme potentiellement délétère dans ce contexte pathologique¹⁷⁴. De la même manière, la spironolactone accentue la dysfonction endothéliale de patients atteints de diabète de type 2 en diminuant la réponse vasodilatatrice en réponse à l'acétylcholine²⁴⁹. En conséquence, il semble que les antagonistes du RM puissent être à l'origine d'effets délétères qui s'ajoutent à l'hyperkaliémie dans des pathologies comme le diabète.

L'angiogenèse est un facteur important dans le développement tumoral qui peut impliquer l'aldostérone et le RM. Une corrélation positive entre la densité vasculaire et l'aldostéronémie est observée chez des patients atteints de tumeurs des glandes surrénales associées à une surproduction d'aldostérone²⁵⁰. De façon concordante, l'éplérénone ralentit le développement tumoral hépatique en induisant l'apoptose des cellules endothéliales et en bloquant l'augmentation d'expression de la protéine VEGF-a dans un modèle murin de cancer du foie²⁵¹. Au contraire, la densité microvasculaire de la tumeur est négativement corrélée avec l'expression du RM chez des patients atteints de cancers colorectaux²⁵². Ces observations contradictoires montrent que l'implication du complexe aldostérone/RM dans l'angiogenèse tumorale est peu connue mais semblent indiquer que son rôle dépend du type de cancer et de l'environnement tissulaire.

4.2.3 MicroARNs

Ce travail a permis de mettre en évidence que le complexe aldostérone/RM module des gènes non-codants comme les microARNs. Nous avons pu identifier et montrer que le miR-1941-5p est régulé spécifiquement par le RM, et pas par le RG, du cardiomyocyte.

L'analyse des gènes modulés spécifiquement par le RM a montré que l'expression du gène codant pour la cadhérine 4 est diminuée dans le cœur des souris non traitées surexprimant spécifiquement le RMh dans le cardiomyocyte par rapport à leur souris contrôle. De plus, la protocadhérine α 4, membre de la superfamille des cadhérines permettant l'adhérence et l'interconnexion des neurones, pourrait être une cible potentielle du miR-1941-5p. Ainsi le miR-1941-5p, en empêchant la transcription de son ARNm, pourrait diminuer l'expression de cette protéine. Puisque l'expression du miR-1941-5p est augmentée et l'expression du gène codant pour la cadhérine 4 diminuée chez les souris RM-Cardio, la cadhérine 4 pourrait ainsi représenter une cible (directe ou indirecte) du miR-1941-5p. Finalement, en accord avec ces données sur la souris, des patients atteints d'une cardiomyopathie associée à des arythmies ventriculaires et à de l'insuffisance cardiaque présentent une diminution de l'expression de certaines cadhérines au niveau des jonctions intercellulaires de type desmosome dans le cœur²⁵³. Ces différents résultats laissent penser que le miR-1941-5p peut moduler les jonctions intercellulaires en agissant principalement sur les protocadhérines. En induisant le remodelage de ces jonctions, la conduction électrique cardiaque (surtout via les jonctions de type Gap) pourrait être altérée et mener à des troubles

du rythme cardiaque si l'effet du miR-1941-5p n'est pas régulé. Dans le contexte pathologique où la voie minéralocorticoïde est suractivée, le complexe aldostérone/RM va donc pouvoir en partie exercer ses effets délétères en augmentant l'expression du miR-1941-5p.

PARTIE 5 : PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a été dédié à l'étude des cibles moléculaires du récepteur minéralocorticoïde dans le cœur. Par trois approches différentes, nous avons approfondi les connaissances sur des gènes dont l'expression est modulée par le RM. Ce travail a donné lieu à deux publications en 2013 et une en 2015.

L'approche pharmacologique avec le torasémide a eu pour but de rechercher si ce diurétique interfère avec la signalisation minéralocorticoïde cardiaque, comparé aux effets de la spironolactone. Nous avons démontré que le torasémide ne peut pas moduler l'expression de gènes impliqués dans les effets délétères du complexe aldostérone/RM. Ce travail a été mené dans le cadre d'une collaboration industrielle avec un laboratoire pharmaceutique s'intéressant aux propriétés potentielles anti-RM du torasémide (première publication en 2013). A ce jour, le torasémide est utilisé pour diminuer la fibrose cardiaque chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque, et est impliqué dans la régulation de la volémie de par ses propriétés diurétiques. La spironolactone bloque les effets délétères du complexe aldostérone/RM impliqués dans les pathologies cardiovasculaires. Nos travaux suggèrent qu'une association du torasémide et de la spironolactone pourrait être envisageable dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, d'autant plus que l'effet diurétique du torasémide augmente l'aldostéronémie qui entraîne en retour une stimulation plus importante du RM. Des études expérimentales et cliniques appropriées seront nécessaires pour analyser les bénéfices thérapeutiques éventuels de cette combinaison.

L'approche génétique s'est intéressée aux gènes cibles du complexe aldostérone/RM dans le cœur.

A partir d'une étude gène candidat, nous avons identifié le gène CTGF comme spécifiquement induit par l'aldostérone et le RM dans le cardiomyocyte, malgré l'absence de 11 β -HSD2 et la présence de glucocorticoïdes en forte concentration dans le milieu environnant. D'ailleurs nous avons montré que les glucocorticoïdes (la corticostérone dans notre étude) ne modulent pas l'expression de ce gène, soulignant une sélectivité forte entre l'aldostérone et les glucocorticoïdes pour ce gène dépendant du RM. Ce travail initié par le docteur Messaoudi et auquel j'ai participé, a permis la caractérisation et la modulation du

gène CTGF et a fait l'objet d'une seconde publication en 2013 ainsi que d'un éditorial dans le journal *Hypertension*.

Ces travaux ont mis en évidence des effets de l'aldostérone *via* le RM du cardiomyocyte, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives sur le rôle du complexe aldostérone/RM en pathologie cardiaque. Nos travaux, associés à d'autres études, suggèrent fortement que la 11 β -HSD2 ne représente donc pas le seul mécanisme de sélectivité permettant à l'aldostérone de se lier au RM, indiquant que l'utilisation d'inhibiteurs de l'aldostérone synthase contrôlant l'aldostéronémie, pourraient être bénéfiques dans le traitement des pathologies cardiaques.

L'approche transcriptomique globale, réalisée de façon comparative sur le cœur de souris surexprimant le RMh dans les cardiomyocytes et sur le cœur des souris contrôles, a mis en évidence pour la première fois qu'une augmentation modeste de la concentration plasmatique en aldostérone régule l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et induit la prolifération des cellules endothéliales cardiaques. Ces résultats permettent d'associer l'aldostérone à de nouveaux processus biologiques et à de nouvelles pathologies où l'angiogenèse est impliquée. Les résultats de cette étude ont été publiés début 2015. De plus, nous avons montré que les souris RM-Cardio, sans stimulation préalable par l'aldostérone, présentent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales cardiaques. Cependant, cette approche transcriptomique globale doit être approfondie. En effet, le mécanisme cellulaire sous-tendant cette prolifération des cellules endothéliales cardiaques n'est pas connu. Une analyse plus profonde des gènes régulés par l'aldostérone dans le cœur des souris RM-Cardio serait souhaitable pour mieux comprendre la synergie entre l'hormone et son récepteur.

Les conséquences physiopathologiques de la prolifération endothéliale dépendante de l'aldostérone méritent d'être analysées plus finement. Une hypothèse mécanistique possible proposée par notre laboratoire, permettant d'expliquer comment les cardiomyocytes et les cellules endothéliales interagissent, est que la prolifération des cellules endothéliales cardiaques est modulée par un stress oxydatif au niveau du cœur. Cette idée fait suite à deux travaux cités précédemment mettant en évidence un effet du RM du cardiomyocyte sur la fonction vasculaire. En effet, les souris RM-Cardio présentent une dysfonction de la réponse de relaxation dépendante du monoxyde d'azote au niveau des artères coronaires et un inhibiteur du stress oxydatif prévient cette dysfonction¹⁷⁵. De plus, le Docteur Messaoudi a montré que la surexpression de l'aldostérone synthase spécifiquement dans le cardiomyocyte protège de la raréfaction du nombre de capillaires, liée au développement du diabète¹⁷⁴. Il serait intéressant de voir si les souris RM-Cardio, qui présentent à l'état de base une

prolifération des cellules endothéliales cardiaques plus importante que celle de leur contrôle, montrent une protection contre la raréfaction capillaire lors de l'induction d'un diabète de type 1.

Finalement, j'ai abordé l'exploration des cibles moléculaires du RM dans le cœur par l'étude des microARNs. Nous avons montré que le miR-1941-5p est spécifiquement régulé par le RM. Nous n'avons pas pu approfondir la pertinence physiopathologique de la surexpression du miR-1941-5p ni déterminer le type cellulaire précis dans lequel il s'exprime. Par conséquent, ce travail est poursuivi dans le cadre du projet européen *Fibrotarget* dans lequel notre laboratoire est impliqué. En collaboration avec l'équipe du Docteur Thomas Thum (Institute for Molecular and Translational Therapeutic Strategies, Hannover, Germany) l'expression du miR-1941-5p sera étudiée dans chacun des différents types cellulaires cardiaques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*. 2006;3:e442
2. Gaziano TA, Opie LH, Weinstein MC. Cardiovascular disease prevention with a multidrug regimen in the developing world: A cost-effectiveness analysis. *Lancet*. 2006;368:679-686
3. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology*. 2010;28:321-342
4. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circulation research*. 1990;67:1355-1364
5. Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Weber KT. Coronary vascular remodeling and myocardial fibrosis in the rat with renovascular hypertension. Response to captopril. *American journal of hypertension*. 1991;4:51-55
6. Meyer WJ, 3rd, Nichols NR. Mineralocorticoid binding in cultured smooth muscle cells and fibroblasts from rat aorta. *Journal of steroid biochemistry*. 1981;14:1157-1168
7. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240:889-895
8. Morrison N, Harrap SB, Arriza JL, Boyd E, Connor JM. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Human genetics*. 1990;85:130-132
9. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: Structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 1987;237:268-275
10. Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F, Fuller PJ. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J Biol Chem*. 1995;270:21016-21020
11. Kwak SP, Patel PD, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. 5'-heterogeneity of the mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid: Differential expression and regulation of splice variants within the rat hippocampus. *Endocrinology*. 1993;133:2344-2350
12. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: Insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nuclear receptor signaling*. 2007;5:e012
13. Zennaro MC, Le Menuet D, Lombes M. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: Evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Molecular endocrinology*. 1996;10:1549-1560
14. Le Menuet D, Viengchareun S, Penfornis P, Walker F, Zennaro MC, Lombes M. Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2000;275:7878-7886
15. Fernandes-Rosa FL, Hubert EL, Fagart J, Tchitchek N, Gomes D, Jouanno E, et al. Mineralocorticoid receptor mutations differentially affect individual gene expression profiles in pseudohypoaldosteronism type 1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96:E519-527

16. Sartorato P, Khaldi Y, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Salomon R, et al. Inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in type i pseudohypoaldosteronism. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;217:119-125
17. Luo JQ, Wang LY, He FZ, Sun NL, Tang GF, Wen JG, et al. Effect of nr3c2 genetic polymorphisms on the blood pressure response to enalapril treatment. *Pharmacogenomics*. 2014;15:201-208
18. van Leeuwen N, Bellingrath S, de Kloet ER, Zitman FG, DeRijk RH, Kudiella BM, et al. Human mineralocorticoid receptor (mr) gene haplotypes modulate mr expression and transactivation: Implication for the stress response. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36:699-709
19. Martinez F, Mansego ML, Escudero JC, Redon J, Chaves FJ. Association of a mineralocorticoid receptor gene polymorphism with hypertension in a spanish population. *American journal of hypertension*. 2009;22:649-655
20. van Leeuwen N, Caprio M, Blaya C, Fumeron F, Sartorato P, Ronconi V, et al. The functional c.-2g>c variant of the mineralocorticoid receptor modulates blood pressure, renin, and aldosterone levels. *Hypertension*. 2010;56:995-1002
21. Nossent AY, Hansen JL, Doggen C, Quax PH, Sheikh SP, Rosendaal FR. Snps in microrna binding sites in 3'-utrs of raas genes influence arterial blood pressure and risk of myocardial infarction. *American journal of hypertension*. 2011;24:999-1006
22. Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, et al. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science*. 2000;289:119-123
23. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: An update. *Human reproduction update*. 2000;6:225-236
24. Fuller PJ, Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*. 2005;46:1227-1235
25. Fuse H, Kitagawa H, Kato S. Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (af-1). *Molecular endocrinology*. 2000;14:889-899
26. Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F181-192
27. Faresse N. Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;143C:334-342
28. Kino T, Jaffe H, Amin ND, Chakrabarti M, Zheng YL, Chrousos GP, et al. Cyclin-dependent kinase 5 modulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor and regulates expression of brain-derived neurotrophic factor. *Molecular endocrinology*. 2010;24:941-952
29. Hirschberg D, Jagerbrink T, Samskog J, Gustafsson M, Stahlberg M, Alvelius G, et al. Detection of phosphorylated peptides in proteomic analyses using microfluidic compact disk technology. *Analytical chemistry*. 2004;76:5864-5871
30. Shibata S, Rinehart J, Zhang J, Moeckel G, Castaneda-Bueno M, Stiegler AL, et al. Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell metabolism*. 2013;18:660-671
31. Marissal-Arvy N, Lombes M, Petterson J, Moisan MP, Mormede P. Gain of function mutation in the mineralocorticoid receptor of the brown norway rat. *J Biol Chem*. 2004;279:39232-39239
32. Le Moellic C, Ouvrard-Pascaud A, Capurro C, Cluzeaud F, Fay M, Jaisser F, et al. Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: Pkcalpha

- activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1145-1160
33. Faresse N, Vitagliano JJ, Staub O. Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation. *FASEB J*. 2012;26:4373-4382
 34. Tallec LP, Kirsh O, Lecomte MC, Viengchareun S, Zennaro MC, Dejean A, et al. Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the n-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: Implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Molecular endocrinology*. 2003;17:2529-2542
 35. Yokota K, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Suda N, Murai-Takeda A, et al. Coactivation of the n-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by ubc9. *J Biol Chem*. 2007;282:1998-2010
 36. Lee HA, Lee DY, Cho HM, Kim SY, Iwasaki Y, Kim IK. Histone deacetylase inhibition attenuates transcriptional activity of mineralocorticoid receptor through its acetylation and prevents development of hypertension. *Circulation research*. 2013;112:1004-1012
 37. Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Reichstein T. [isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism]. *Experientia*. 1953;9:333-335
 38. MacKenzie SM, Fraser R, Connell JM, Davies E. Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2002;3:214-221
 39. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine reviews*. 2003;24:261-271
 40. Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of ad4bp/sf-1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 1996;1:663-671
 41. Connell JM, MacKenzie SM, Freel EM, Fraser R, Davies E. A lifetime of aldosterone excess: Long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function. *Endocrine reviews*. 2008;29:133-154
 42. Pralong WF, Hunyady L, Varnai P, Wollheim CB, Spat A. Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:132-136
 43. Bassett MH, White PC, Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;217:67-74
 44. Denner K, Rainey WE, Pezzi V, Bird IM, Bernhardt R, Mathis JM. Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical h295r cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1996;121:87-91
 45. Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S, Rainey WE. Calmodulin-dependent kinase i regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology*. 2002;143:3651-3657
 46. Sirianni R, Sirianni R, Carr BR, Pezzi V, Rainey WE. A role for src tyrosine kinase in regulating adrenal aldosterone production. *Journal of molecular endocrinology*. 2001;26:207-215
 47. Spat A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: A model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiological reviews*. 2004;84:489-539
 48. Nogueira EF, Xing Y, Morris CA, Rainey WE. Role of angiotensin ii-induced rapid response genes in the regulation of enzymes needed for aldosterone synthesis. *Journal of molecular endocrinology*. 2009;42:319-330

49. Atef ME, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of gqalpha and plc-beta1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in shr: Role of endogenous angiotensin ii and endothelin-1. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2014;307:C97-106
50. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002;296:1636-1639
51. Holland OB, Carr B. Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. *Endocrinology*. 1993;132:2666-2673
52. Aguilera G, Fujita K, Catt KJ. Mechanisms of inhibition of aldosterone secretion by adrenocorticotropin. *Endocrinology*. 1981;108:522-528
53. Abayasekara DR, Vazir H, Whitehouse BJ, Price GM, Hinson JP, Vinson GP. Studies on the mechanisms of acth-induced inhibition of aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. *The Journal of endocrinology*. 1989;122:625-632
54. Lin L, Hindmarsh PC, Metherell LA, Alzyoud M, Al-Ali M, Brain CE, et al. Severe loss-of-function mutations in the adrenocorticotropin receptor (acthr, mc2r) can be found in patients diagnosed with salt-losing adrenal hypoplasia. *Clinical endocrinology*. 2007;66:205-210
55. Kuppusamy M, Caroccia B, Stindl J, Bandulik S, Lenzini L, Gioco F, et al. A novel kcnj5-inst149 somatic mutation close to, but outside, the selectivity filter causes resistant hypertension by loss of selectivity for potassium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99:E1765-1773
56. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, et al. Somatic mutations in atpl1a1 and cacna1d underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nature genetics*. 2013;45:1055-1060
57. Monticone S, Else T, Mulatero P, Williams TA, Rainey WE. Understanding primary aldosteronism: Impact of next generation sequencing and expression profiling. *Mol Cell Endocrinol*. 2014
58. Young M, Funder JW. Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology*. 2004;145:3153-3157
59. Rickard AJ, Funder JW, Morgan J, Fuller PJ, Young MJ. Does glucocorticoid receptor blockade exacerbate tissue damage after mineralocorticoid/salt administration? *Endocrinology*. 2007;148:4829-4835
60. Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, et al. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*. 1988;2:986-989
61. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: Target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*. 1988;242:583-585
62. Bocchi B, Fagart J, Cluzeaud F, Fay M, Rafestin-Oblin ME, Farman N. Glucocorticoid metabolism by 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 modulates human mineralocorticoid receptor transactivation activity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;84:239-244
63. Rebuffat AG, Tam S, Nawrocki AR, Baker ME, Frey BM, Frey FJ, et al. The 11-ketosteroid 11-ketodexamethasone is a glucocorticoid receptor agonist. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;214:27-37
64. Bonvalet JP, Doignon I, Blot-Chabaud M, Pradelles P, Farman N. Distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase along the rabbit nephron. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86:832-837
65. Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*. 1995;92:175-182

66. Turchin A, Guo CZ, Adler GK, Ricchiuti V, Kohane IS, Williams GH. Effect of acute aldosterone administration on gene expression profile in the heart. *Endocrinology*. 2006;147:3183-3189
67. Muller O, Pradervand S, Berger S, Centeno G, Milet A, Nicod P, et al. Identification of corticosteroid-regulated genes in cardiomyocytes by serial analysis of gene expression. *Genomics*. 2007;89:370-377
68. Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A. Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: Clues to cardiac remodeling? *Endocrinology*. 2007;148:1502-1510
69. Latouche C, Sainte-Marie Y, Steenman M, Castro Chaves P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, et al. Molecular signature of mineralocorticoid receptor signaling in cardiomyocytes: From cultured cells to mouse heart. *Endocrinology*. 2010;151:4467-4476
70. Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, et al. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension*. 2013;61:361-367
71. Funder JW, Feldman D, Edelman IS. The roles of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology*. 1973;92:994-1004
72. Sorensen MV, Praetorius HA, Nykjaer A, Willnow T, Leipziger J. Impaired aldosterone responsiveness in corticosteroid binding globulin deficient mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;201:169-177
73. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual review of biochemistry*. 1989;58:137-171
74. Hellal-Levy C, Couette B, Fagart J, Souque A, Gomez-Sanchez C, Rafestin-Oblin M. Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS letters*. 1999;464:9-13
75. Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, Holsboer F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: A new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*. 1994;13:1457-1462
76. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Eddleman FC, Gomez-Sanchez EP. Corticosteroid synthesis in the central nervous system. *Endocrine research*. 1996;22:463-470
77. Yu L, Romero DG, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP. Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;190:9-17
78. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*. 1998;273:4883-4891
79. Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85:2519-2525
80. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, et al. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: Effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation*. 1999;99:2694-2701
81. Mune T, Rogerson FM, Nikkila H, Agarwal AK, White PC. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nature genetics*. 1995;10:394-399
82. Ulick S, Levine LS, Gunczler P, Zanonato G, Ramirez LC, Rauh W, et al. A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the

- peripheral metabolism of cortisol. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1979;49:757-764
83. White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrine reviews*. 1997;18:135-156
 84. Draper N, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *The Journal of endocrinology*. 2005;186:251-271
 85. Maron BA, Leopold JA. Aldosterone receptor antagonists: Effective but often forgotten. *Circulation*. 2010;121:934-939
 86. Wolf RL, Mendlowitz M, Roboz J, Styan GP, Kornfeld P, Weigl A. Treatment of hypertension with spironolactone. Double-blind study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1966;198:1143-1149
 87. Bauersachs J. The arts of third-generation mineralocorticoid receptor antagonists: Achieving cardiovascular benefit with minimized renal side effects? *European heart journal*. 2013;34:2426-2428
 88. Kolkhof P, Borden SA. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: Prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;350:310-317
 89. Fagart J, Hillisch A, Huyet J, Barfacker L, Fay M, Pleiss U, et al. A new mode of mineralocorticoid receptor antagonism by a potent and selective nonsteroidal molecule. *J Biol Chem*. 2010;285:29932-29940
 90. Chapman N, Dobson J, Wilson S, Dahlof B, Sever PS, Wedel H, et al. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension*. 2007;49:839-845
 91. Colussi G, Catena C, Sechi LA. Spironolactone, eplerenone and the new aldosterone blockers in endocrine and primary hypertension. *Journal of hypertension*. 2013;31:3-15
 92. Weinberger MH, Roniker B, Krause SL, Weiss RJ. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension. *American journal of hypertension*. 2002;15:709-716
 93. Benter IF, Babiker F, Al-Rashdan I, Yousif M, Akhtar S. Ru28318, an aldosterone antagonist, in combination with an ace inhibitor and angiotensin receptor blocker attenuates cardiac dysfunction in diabetes. *Journal of diabetes research*. 2013;2013:427693
 94. Provencher M, Houde V, Brochu M, St-Louis J. Mineralocorticoids participate in the reduced vascular reactivity of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H1195-1201
 95. White WB, Duprez D, St Hillaire R, Krause S, Roniker B, Kuse-Hamilton J, et al. Effects of the selective aldosterone blocker eplerenone versus the calcium antagonist amlodipine in systolic hypertension. *Hypertension*. 2003;41:1021-1026
 96. Williams GH, Burgess E, Kolloch RE, Ruilope LM, Niegowska J, Kipnes MS, et al. Efficacy of eplerenone versus enalapril as monotherapy in systemic hypertension. *The American journal of cardiology*. 2004;93:990-996
 97. Weinberger MH, White WB, Ruilope LM, MacDonald TM, Davidson RC, Roniker B, et al. Effects of eplerenone versus losartan in patients with low-renin hypertension. *American heart journal*. 2005;150:426-433
 98. Borghi C, Boschi S, Ambrosioni E, Melandri G, Branzi A, Magnani B. Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ace inhibitors. *Journal of clinical pharmacology*. 1993;33:40-45

99. McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, et al. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: Randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (resolvd) pilot study. The resolvd pilot study investigators. *Circulation*. 1999;100:1056-1064
100. Vantrimpont P, Rouleau JL, Ciampi A, Harel F, de Champlain J, Bichet D, et al. Two-year time course and significance of neurohumoral activation in the survival and ventricular enlargement (save) study. *European heart journal*. 1998;19:1552-1563
101. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshtus J, Snapinn S. Effects of enalapril and neuroendocrine activation on prognosis in severe congestive heart failure (follow-up of the consensus trial). Consensus trial study group. *The American journal of cardiology*. 1990;66:40D-44D; discussion 44D-45D
102. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized aldactone evaluation study investigators. *The New England journal of medicine*. 1999;341:709-717
103. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: Insights from the randomized aldactone evaluation study (rales). Rales investigators. *Circulation*. 2000;102:2700-2706
104. Vizzardi E, D'Aloia A, Giubbini R, Bordonali T, Bugatti S, Pezzali N, et al. Effect of spironolactone on left ventricular ejection fraction and volumes in patients with class i or ii heart failure. *The American journal of cardiology*. 2010;106:1292-1296
105. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2003;348:1309-1321
106. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *The New England journal of medicine*. 2011;364:11-21
107. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, et al. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *The New England journal of medicine*. 2014;370:1383-1392
108. Elguindy AM. Topcat misses its primary endpoint: Should spironolactone be abandoned in hfpef? *Global cardiology science & practice*. 2013;2013:357-360
109. McMurray JJ, O'Connor C. Lessons from the topcat trial. *The New England journal of medicine*. 2014;370:1453-1454
110. Pfeffer MA, Claggett B, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Clausell N, et al. Regional variation in patients and outcomes in the treatment of preserved cardiac function heart failure with an aldosterone antagonist (topcat) trial. *Circulation*. 2014
111. Montalescot G, Pitt B, Lopez de Sa E, Hamm CW, Flather M, Verheugt F, et al. Early eplerenone treatment in patients with acute st-elevation myocardial infarction without heart failure: The randomized double-blind reminder study. *European heart journal*. 2014;35:2295-2302
112. Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, et al. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction. *Circulation*. 2003;107:2786-2792
113. Dabrowski R, Borowiec A, Smolis-Bak E, Kowalik I, Sosnowski C, Kraska A, et al. Effect of combined spironolactone-beta-blocker +/- enalapril treatment on occurrence of symptomatic atrial fibrillation episodes in patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation (spir-af study). *The American journal of cardiology*. 2010;106:1609-1614

114. Pitt B, Kober L, Ponikowski P, Gheorghiade M, Filippatos G, Krum H, et al. Safety and tolerability of the novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist bay 94-8862 in patients with chronic heart failure and mild or moderate chronic kidney disease: A randomized, double-blind trial. *European heart journal*. 2013;34:2453-2463
115. Nguyen Dinh Cat A, Jaisser F. Extrarenal effects of aldosterone. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2012;21:147-156
116. Gekle M, Golenhofen N, Oberleithner H, Silbernagl S. Rapid activation of Na^+/H^+ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca^{2+} and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10500-10504
117. Harvey BJ, Alzamora R, Stubbs AK, Irnaten M, McEneaney V, Thomas W. Rapid responses to aldosterone in the kidney and colon. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;108:310-317
118. Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, et al. Gpr30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension*. 2011;57:442-451
119. Callera GE, Yogi A, Briones AM, Montezano AC, He Y, Tostes RC, et al. Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-src trafficking to cholesterol-rich microdomains: Role of pdgfr. *Cardiovascular research*. 2011;91:720-731
120. Michea L, Delpiano AM, Hitschfeld C, Lobos L, Lavandero S, Marusic ET. Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na^+/H^+ exchanger, intracellular Ca^{2+} levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology*. 2005;146:973-980
121. Binart N, Lombes M, Baulieu EE. Distinct functions of the 90 kda heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: Effects of hsp90 deletion mutants. *The Biochemical journal*. 1995;311 (Pt 3):797-804
122. Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010;75:1-12
123. Nicolaides NC, Charmandari E, Chrousos GP, Kino T. Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: Novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor. *BMC endocrine disorders*. 2014;14:71
124. Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchovsky N, Koop BF, et al. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: Evidence for differential steroid receptor response elements. *Molecular endocrinology*. 1999;13:2090-2107
125. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*. 2001;81:1269-1304
126. Rogatsky I, Wang JC, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq CM, et al. Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13845-13850
127. Yang J, Young MJ. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *Journal of molecular endocrinology*. 2009;43:53-64
128. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: A coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development*. 2006;20:1405-1428

129. Meijer OC, Kalkhoven E, van der Laan S, Steenbergen PJ, Houtman SH, Dijkmans TF, et al. Steroid receptor coactivator-1 splice variants differentially affect corticosteroid receptor signaling. *Endocrinology*. 2005;146:1438-1448
130. Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ, Lombes M. The elongation factor ell (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Molecular endocrinology*. 2005;19:1158-1169
131. Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: A journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular endocrinology*. 2005;19:2211-2221
132. Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;217:203-212
133. Lee NV, Miller PW, Buono MJ. The effect of spironolactone on sweat and urinary sodium excretion during exercise in humans. *Clinical physiology and functional imaging*. 2010;30:13-16
134. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 1994;367:463-467
135. Horisberger JD, Jaunin P, Good PJ, Rossier BC, Geering K. Coexpression of α 1 with putative β 3 subunits results in functional Na^+/K^+ pumps in xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8397-8400
136. Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, et al. Sgk integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F303-313
137. Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, et al. Phosphorylation of nedd4-2 by sgk1 regulates epithelial Na^+ channel cell surface expression. *The EMBO journal*. 2001;20:7052-7059
138. Snyder PM, Olson DR, Thomas BC. Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na^+ channel. *J Biol Chem*. 2002;277:5-8
139. Rossier BC. Epithelial sodium channel (enac) and the control of blood pressure. *Current opinion in pharmacology*. 2014;15:33-46
140. Butterworth MB. Regulation of the epithelial sodium channel (enac) by membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802:1166-1177
141. Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, Pearce D. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem*. 2005;280:39970-39981
142. Soundararajan R, Melters D, Shih IC, Wang J, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by differential composition of a signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:7804-7809
143. Bhalla V, Soundararajan R, Pao AC, Li H, Pearce D. Disinhibitory pathways for control of sodium transport: Regulation of enac by sgk1 and gilz. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291:F714-721
144. Soundararajan R, Pearce D, Hughey RP, Kleyman TR. Role of epithelial sodium channels and their regulators in hypertension. *J Biol Chem*. 2010;285:30363-30369
145. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: Function, structure, and regulation. *Physiological reviews*. 1997;77:359-396
146. Oberleithner H, Riethmuller C, Ludwig T, Shahin V, Stock C, Schwab A, et al. Differential action of steroid hormones on human endothelium. *Journal of cell science*. 2006;119:1926-1932

147. Warnock DG, Kusche-Vihrog K, Tarjus A, Sheng S, Oberleithner H, Kleyman TR, et al. Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nature reviews. Nephrology*. 2014;10:146-157
148. Caprio M, Newfell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, et al. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circulation research*. 2008;102:1359-1367
149. Shen JZ, Young MJ. Corticosteroids, heart failure, and hypertension: A role for immune cells? *Endocrinology*. 2012;153:5692-5700
150. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation research*. 2013;112:1624-1633
151. Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ, et al. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circulation research*. 2003;93:69-76
152. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C. Increased cardiac types i and iii collagen mrnas in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension*. 1994;24:30-36
153. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouve P, Wassef M, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension*. 1995;26:971-978
154. Endemann DH, Touyz RM, Iglarz M, Savoia C, Schiffrin EL. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2004;43:1252-1257
155. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1992;120:893-901
156. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1993;25:563-575
157. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz*. 2000;25:299-306
158. Sun Y, Zhang J, Lu L, Bedigian MP, Robinson AD, Weber KT. Tissue angiotensin ii in the regulation of inflammatory and fibrogenic components of repair in the rat heart. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2004;143:41-51
159. Marney AM, Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage. *Clinical science*. 2007;113:267-278
160. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1802-1810
161. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : Role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2002;161:1773-1781
162. Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension*. 2006;47:656-664
163. Wang D, Liu YH, Yang XP, Rhaleb NE, Xu J, Peterson E, et al. Role of a selective aldosterone blocker in mice with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2004;10:67-73
164. Kuster GM, Kotlyar E, Rude MK, Siwik DA, Liao R, Colucci WS, et al. Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure

- and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation*. 2005;111:420-427
165. Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishio M, et al. Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292:R946-954
 166. Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Anegawa T, et al. Blood pressure variability activates cardiac mineralocorticoid receptor and induces cardiac remodeling in hypertensive rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2013;77:1474-1481
 167. Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM, Judge S, Heo J, Colucci WS, et al. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension*. 2005;46:555-561
 168. Wang M, Zhang J, Walker SJ, Dworakowski R, Lakatta EG, Shah AM. Involvement of nadph oxidase in age-associated cardiac remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48:765-772
 169. Garnier A, Bendall JK, Fuchs S, Escoubet B, Rochais F, Hoerter J, et al. Cardiac specific increase in aldosterone production induces coronary dysfunction in aldosterone synthase-transgenic mice. *Circulation*. 2004;110:1819-1825
 170. Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Benitah JP, Perrier R, Soukaseum C, Nguyen Dinh Cat A, et al. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2005;111:3025-3033
 171. Azibani F, Benard L, Schlossarek S, Merval R, Tournoux F, Fazal L, et al. Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart. *Hypertension*. 2012;59:1179-1187
 172. Azibani F, Devaux Y, Coutance G, Schlossarek S, Polidano E, Fazal L, et al. Aldosterone inhibits the fetal program and increases hypertrophy in the heart of hypertensive mice. *PloS one*. 2012;7:e38197
 173. Ambroisine ML, Favre J, Oliviero P, Rodriguez C, Gao J, Thuillez C, et al. Aldosterone-induced coronary dysfunction in transgenic mice involves the calcium-activated potassium (bkca) channels of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2007;116:2435-2443
 174. Messaoudi S, Milliez P, Samuel JL, Delcayre C. Cardiac aldosterone overexpression prevents harmful effects of diabetes in the mouse heart by preserving capillary density. *FASEB J*. 2009;23:2176-2185
 175. Favre J, Gao J, Zhang AD, Remy-Jouet I, Ouvrard-Pascaud A, Dautreux B, et al. Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H2035-2043
 176. Lothar A, Berger S, Gilsbach R, Rosner S, Ecke A, Barreto F, et al. Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function. *Hypertension*. 2011;57:746-754
 177. Fraccarollo D, Berger S, Galuppo P, Kneitz S, Hein L, Schutz G, et al. Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2011;123:400-408
 178. Rickard AJ, Morgan J, Bienvenu LA, Fletcher EK, Cranston GA, Shen JZ, et al. Cardiomyocyte mineralocorticoid receptors are essential for deoxycorticosterone/salt-mediated inflammation and cardiac fibrosis. *Hypertension*. 2012;60:1443-1450
 179. Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against

- deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension*. 2009;54:537-543
180. Beygui F, Collet JP, Benoliel JJ, Vignolles N, Dumaine R, Barthelemy O, et al. High plasma aldosterone levels on admission are associated with death in patients presenting with acute st-elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114:2604-2610
 181. Beygui F, Labbe JP, Cayla G, Ennezat PV, Motreff P, Roubille F, et al. Early mineralocorticoid receptor blockade in primary percutaneous coronary intervention for st-elevation myocardial infarction is associated with a reduction of life-threatening ventricular arrhythmia. *International journal of cardiology*. 2013;167:73-79
 182. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45:1243-1248
 183. Goette A, Hoffmanns P, Enayati W, Meltendorf U, Geller JC, Klein HU. Effect of successful electrical cardioversion on serum aldosterone in patients with persistent atrial fibrillation. *The American journal of cardiology*. 2001;88:906-909, A908
 184. Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Hwang JJ, Kuo KT, Wu CK, et al. Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55:758-770
 185. De-An P, Li L, Zhi-Yun X, Jin-Yu H, Zheng-Ming X, Min W, et al. Increased expression of mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human atria during atrial fibrillation. *Clinical cardiology*. 2010;33:23-29
 186. Williams RS, deLemos JA, Dimas V, Reisch J, Hill JA, Naseem RH. Effect of spironolactone on patients with atrial fibrillation and structural heart disease. *Clinical cardiology*. 2011;34:415-419
 187. Lalevee N, Rebsamen MC, Barrere-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Benitah JP, et al. Aldosterone increases t-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research*. 2005;67:216-224
 188. Perrier R, Richard S, Sainte-Marie Y, Rossier BC, Jaisser F, Hummler E, et al. A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac l-type Ca^{2+} current in mice. *J Physiol*. 2005;569:153-162
 189. Benitah JP, Vassort G. Aldosterone upregulates Ca^{2+} current in adult rat cardiomyocytes. *Circulation research*. 1999;85:1139-1145
 190. Gomez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, Pereira L, Zissimopoulos S, Zhu X, et al. Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of fk506-binding proteins. *Circulation*. 2009;119:2179-2187
 191. De Mello WC. Beneficial effect of eplerenone on cardiac remodelling and electrical properties of the failing heart. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2006;7:40-46
 192. Qu J, Volpicelli FM, Garcia LI, Sandeep N, Zhang J, Marquez-Rosado L, et al. Gap junction remodeling and spironolactone-dependent reverse remodeling in the hypertrophied heart. *Circulation research*. 2009;104:365-371
 193. Zhao J, Li J, Li W, Li Y, Shan H, Gong Y, et al. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol*. 2010;159:1584-1594
 194. Shi Y, Li D, Tardif JC, Nattel S. Enalapril effects on atrial remodeling and atrial fibrillation in experimental congestive heart failure. *Cardiovascular research*. 2002;54:456-461

195. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4:249-264
196. Gouilleux F, Sola B, Couette B, Richard-Foy H. Cooperation between structural elements in hormono-regulated transcription from the mouse mammary tumor virus promoter. *Nucleic acids research*. 1991;19:1563-1569
197. Uchida T, Yamanaga K, Nishikawa M, Ohtaki Y, Kido H, Watanabe M. Anti-aldosteronergic effect of torasemide. *European journal of pharmacology*. 1991;205:145-150
198. Lopez B, Querejeta R, Gonzalez A, Beaumont J, Larman M, Diez J. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension*. 2009;53:236-242
199. Veeraveedu PT, Watanabe K, Ma M, Palaniyandi SS, Yamaguchi K, Suzuki K, et al. Torasemide, a long-acting loop diuretic, reduces the progression of myocarditis to dilated cardiomyopathy. *European journal of pharmacology*. 2008;581:121-131
200. Shalitin N, Schlesinger H, Levy MJ, Kessler E, Kessler-Icekson G. Expression of procollagen c-proteinase enhancer in cultured rat heart fibroblasts: Evidence for co-regulation with type i collagen. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;90:397-407
201. Cosin J, Diez J, investigators T. Torasemide in chronic heart failure: Results of the toric study. *European journal of heart failure*. 2002;4:507-513
202. Uechi M, Matsuoka M, Kuwajima E, Kaneko T, Yamashita K, Fukushima U, et al. The effects of the loop diuretics furosemide and torasemide on diuresis in dogs and cats. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2003;65:1057-1061
203. Yamato M, Sasaki T, Honda K, Fukuda M, Akutagawa O, Okamoto M, et al. Effects of torasemide on left ventricular function and neurohumoral factors in patients with chronic heart failure. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2003;67:384-390
204. Goodfriend TL, Ball DL, Oelkers W, Bahr V. Torsemide inhibits aldosterone secretion in vitro. *Life sciences*. 1998;63:PL45-50
205. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3:35-45
206. Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: Themes, variations, and therapeutic strategies. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:147-176
207. Schellings MW, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: Possible role during stress and remodeling. *Cardiovascular research*. 2004;64:24-31
208. Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, Lotz JC, et al. Tenascin-x deficiency mimics ehlers-danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nature genetics*. 2002;30:421-425
209. Mackiewicz A, Mackiewicz K. Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconjugate journal*. 1995;12:241-247
210. de Bold AJ. Thirty years of research on atrial natriuretic factor: Historical background and emerging concepts. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2011;89:527-531
211. Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, Huang DY, Hussain A, Berchtold S, et al. Sgk1-dependent cardiac ctgf formation and fibrosis following doca treatment. *Journal of molecular medicine*. 2006;84:396-404
212. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by

- connective tissue growth factor. *The Journal of investigative dermatology*. 1996;107:404-411
213. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. Ctgf expression is induced by tgf- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: A potential role in heart fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32:1805-1819
 214. Cai Y, Yu SS, Chen TT, Gao S, Geng B, Yu Y, et al. Egcg inhibits ctgf expression via blocking nf-kappab activation in cardiac fibroblast. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2013;20:106-113
 215. Cicha I, Goppelt-Struebe M. Connective tissue growth factor: Context-dependent functions and mechanisms of regulation. *BioFactors*. 2009;35:200-208
 216. Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;195:321-338
 217. Funder JW. Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor. *Hypertension*. 2009;53:286-290
 218. Brigstock DR. Connective tissue growth factor (ccn2, ctgf) and organ fibrosis: Lessons from transgenic animals. *Journal of cell communication and signaling*. 2010;4:1-4
 219. Konishi A, Tazawa C, Miki Y, Darnel AD, Suzuki T, Ohta Y, et al. The possible roles of mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;85:439-442
 220. Wei J, Ni J, Huang D, Chen M, Yan S, Peng Y. The effect of aldosterone antagonists for ventricular arrhythmia: A meta-analysis. *Clinical cardiology*. 2010;33:572-577
 221. Ladage D, Schutzeberg N, Dartsch T, Krausgrill B, Halbach M, Zobel C, et al. Hyperaldosteronism is associated with a decrease in number and altered growth factor expression of endothelial progenitor cells in rats. *International journal of cardiology*. 2011;149:152-156
 222. Wu VC, Lo SC, Chen YL, Huang PH, Tsai CT, Liang CJ, et al. Endothelial progenitor cells in primary aldosteronism: A biomarker of severity for aldosterone vasculopathy and prognosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:3175-3183
 223. Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Miller AG. Identification of a retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. *Circulation research*. 2009;104:124-133
 224. Michel F, Ambroisine ML, Duriez M, Delcayre C, Levy BI, Silvestre JS. Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin ii-dependent pathway. *Circulation*. 2004;109:1933-1937
 225. Jaffe IZ, Newfell BG, Aronovitz M, Mohammad NN, McGraw AP, Perreault RE, et al. Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120:3891-3900
 226. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating ki-rasa and mapk1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H176-184
 227. Ishizawa K, Izawa Y, Ito H, Miki C, Miyata K, Fujita Y, et al. Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. *Hypertension*. 2005;46:1046-1052
 228. Pruthi D, McCurley A, Aronovitz M, Galayda C, Karumanchi SA, Jaffe IZ. Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:355-364

229. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Journal of molecular medicine*. 2013;91:323-328
230. Deliyanti D, Miller AG, Tan G, Binger KJ, Samson AL, Wilkinson-Berka JL. Neovascularization is attenuated with aldosterone synthase inhibition in rats with retinopathy. *Hypertension*. 2012;59:607-613
231. Ambros V. The functions of animal micrornas. *Nature*. 2004;431:350-355
232. Hwang HW, Mendell JT. Micrornas in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British journal of cancer*. 2006;94:776-780
233. Dangwal S, Thum T. Microrna therapeutics in cardiovascular disease models. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2014;54:185-203
234. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. Micrornas are aberrantly expressed in hypertrophic heart: Do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol*. 2007;170:1831-1840
235. Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. Microrna-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature medicine*. 2007;13:613-618
236. Thum T. Microrna therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO molecular medicine*. 2012;4:3-14
237. Couette B, Lombes M, Baulieu EE, Rafestin-Oblin ME. Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticosteroid receptor. *The Biochemical journal*. 1992;282 (Pt 3):697-702
238. Bonvalet JP, Blot-Chabaud M, Farman N. Autoradiographic evidence of nuclear binding of spironolactone in rabbit cortical collecting tubule. *Endocrinology*. 1991;128:280-284
239. Rogerson FM, Yao YZ, Smith BJ, Dimopoulos N, Fuller PJ. Determinants of spironolactone binding specificity in the mineralocorticoid receptor. *Journal of molecular endocrinology*. 2003;31:573-582
240. Weber M, Wehling M, Losel R. Proteins interact with the cytosolic mineralocorticoid receptor depending on the ligand. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H361-365
241. Mihailidou AS, Loan Le TY, Mardini M, Funder JW. Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. *Hypertension*. 2009;54:1306-1312
242. Guder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Allolio B, Ertl G, et al. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation*. 2007;115:1754-1761
243. Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: Its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiological reviews*. 2003;83:59-115
244. Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, et al. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nature medicine*. 2007;13:189-197
245. Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension*. 2003;42:49-55
246. Kirsch T, Beese M, Wyss K, Klinge U, Haller H, Haubitz M, et al. Aldosterone modulates endothelial permeability and endothelial nitric oxide synthase activity by rearrangement of the actin cytoskeleton. *Hypertension*. 2013;61:501-508
247. Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires tgf-beta. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120:3520-3529

248. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine*. 2007;13:952-961
249. Davies JJ, Band M, Morris A, Struthers AD. Spironolactone impairs endothelial function and heart rate variability in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47:1687-1694
250. Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, et al. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87:4961-4965
251. Kaji K, Yoshiji H, Kitade M, Ikenaka Y, Noguchi R, Shirai Y, et al. Selective aldosterone blocker, eplerenone, attenuates hepatocellular carcinoma growth and angiogenesis in mice. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2010;40:540-549
252. Tiberio L, Nascimbeni R, Villanacci V, Casella C, Fra A, Vezzoli V, et al. The decrease of mineralcorticoid receptor drives angiogenic pathways in colorectal cancer. *PloS one*. 2013;8:e59410
253. Vite A, Gandjbakhch E, Prost C, Fressart V, Fouret P, Neyroud N, et al. Desmosomal cadherins are decreased in explanted arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy patient hearts. *PloS one*. 2013;8:e75082

ANNEXES

De l'article "Aldosterone-Specific Activation of Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor *In Vivo*"

- Supplemental table S2 : Microarray predicted MR regulated genes

(MR untreated vs Ctrl untreated)

- Supplemental table S3 : Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice

(Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR-Cardio mice)

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

p-value	FC	EntrezGeneID	GeneSymbol	Description
Down-regulated genes				
0.0012	2.00	404195	Cyp2c54	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 54 (Cyp2c54), mRNA
0.0001	2.00	76509	1600029D21Rik	RIKEN cDNA 1600029D21 gene (1600029D21Rik), mRNA
0.0046	2.00	270109	Pcnxl2	pecanex-like 2 (Drosophila) (Pcnxl2), transcript variant 2, mRNA
0.0376	2.01	20526	Slc2a2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (Slc2a2), mRNA
0.0000	2.01	171283	Havcr1	strain BALB/c TIM1 mRNA, complete cds
0.0000	2.01	13117	Cyp4a10	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10 (Cyp4a10), mRNA
0.0062	2.01	72168	Aifm3	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3 (Aifm3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0091	2.01	216188	Aldh1l2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2 (Aldh1l2), mRNA
0.0013	2.01	100038958	Gm1984	PREDICTED: similar to Ubtf protein (LOC100038958), mRNA
0.0020	2.01	13162	Slc6a3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3 (Slc6a3), mRNA
0.0192	2.01	99171	AU015584	AU015584 Mouse two-cell stage embryo cDNA cDNA clone J0713G11 3'.
0.0324	2.01	20264	Scn10a	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha (Scn10a), mRNA
0.0008	2.01	245536	Gm614	predicted gene 614 (Gm614), mRNA
0.0096	2.01	640856	LOC640856	PREDICTED: similar to Coenzyme Q9 homolog (yeast) (LOC640856), mRNA
0.0094	2.01	100047015	LOC100047015	PREDICTED: similar to guanylate cyclase 1, soluble, beta 2 (LOC100047015), mRNA
0.0026	2.02	102075	Plekhg4	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4 (Plekhg4), mRNA
0.0000	2.02	15458	Hpx	hemopexin (Hpx), mRNA
0.0000	2.02	666168	Cyp4a31	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 31 (Cyp4a31), mRNA
0.0093	2.02	382562	Pfn4	profilin family, member 4 (Pfn4), mRNA
0.0018	2.02	635396	Gm7157	PREDICTED: hypothetical LOC635396 (LOC635396), mRNA
0.0000	2.02	677171	LOC677171	PREDICTED: similar to chromosome 10 open reading frame 79 (LOC677171), mRNA
0.0271	2.02	230909	Gm572	predicted gene 572 (Gm572), mRNA
0.0350	2.02	58243	Nap1l5	nucleosome assembly protein 1-like 5 (Nap1l5), mRNA
0.0051	2.02	19752	Rnase1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic) (Rnase1), mRNA
0.0305	2.02	12561	Cdh4	cadherin 4 (Cdh4), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0043	2.03	669759	Gm9468	PREDICTED: similar to Ubtg protein (LOC669759), misc RNA
0.0000	2.03	14778	Gpx3	glutathione peroxidase 3 (Gpx3), transcript variant 2, mRNA
0.0002	2.03	259302	Srgap3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 (Srgap3), mRNA
0.0026	2.03	74342	Lrrtm1	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1 (Lrrtm1), mRNA
0.0001	2.03	13119	Cyp4a14	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14 (Cyp4a14), mRNA
0.0012	2.03	244425	A730069N07Rik	RIKEN cDNA A730069N07 gene (A730069N07Rik), mRNA
0.0063	2.03	75216	4930534B04Rik	RIKEN cDNA 4930534B04 gene (4930534B04Rik), mRNA
0.0114	2.03	114663	Impa2	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 (Impa2), mRNA
0.0005	2.03	57138	Slc12a5	solute carrier family 12, member 5 (Slc12a5), mRNA
0.0001	2.03	80794	Cblc	Casitas B-lineage lymphoma c (Cblc), transcript variant 1, mRNA
0.0038	2.03	100046146	LOC100046146	TRAV18 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q5R1A9]
0.0000	2.04	12355	Nr1i3	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 (Nr1i3), mRNA
0.0003	2.04	232493	Gys2	glycogen synthase 2 (Gys2), mRNA
0.0005	2.04	67077	1700019N12Rik	RIKEN cDNA 1700019N12 gene (1700019N12Rik), mRNA
0.0015	2.04	241612	Slc5a12	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12 (Slc5a12), transcript variant 1, mRNA
0.0193	2.04	12922	Crhr2	corticotropin releasing hormone receptor 2 (Crhr2), mRNA
0.0217	2.04	109593	Lmo3	LIM domain only 3 (Lmo3), mRNA
0.0000	2.05	13838	Epha4	Eph receptor A4 (Epha4), mRNA
0.0341	2.05	20745	Spock1	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1 (Spock1), transcript variant 1, mRNA
0.0000	2.05	22072	Prss2	protease, serine, 2 (Prss2), mRNA
0.0000	2.05	20743	Spnb3	spectrin beta 3 (Spnb3), mRNA
0.0154	2.05	12000	Avpr2	arginine vasopressin receptor 2 (Avpr2), mRNA
0.0090	2.05	67629	Spc24	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae) (Spc24), mRNA
0.0000	2.05	13799	En2	engrailed 2 (En2), mRNA
0.0021	2.05	103220	BC030307	cDNA sequence BC030307 (BC030307), transcript variant 3, mRNA
0.0002	2.05	15486	Hsd17b2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 (Hsd17b2), mRNA
0.0008	2.05	100045718	LOC100045718	PREDICTED: similar to Ubtg protein (LOC100045718), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0035	2.05	70291	2510049J12Rik	RIKEN cDNA 2510049J12 gene (2510049J12Rik), mRNA
0.0067	2.06	57329	Otor	otoraplin (Otor), mRNA
0.0005	2.06	258524	Olfr1168	olfactory receptor 1168 (Olfr1168), mRNA
0.0421	2.06	100042941	Gm4118	PREDICTED: similar to proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2 (LOC100042941), misc RNA
0.0002	2.06	234724	Tat	tyrosine aminotransferase (Tat), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0000	2.06	319625	Galm	galactose mutarotase (Galm), mRNA
0.0051	2.06	676278	LOC676278	PREDICTED: similar to leucine rich repeat containing 48 (LOC676278), mRNA
0.0070	2.06	277753	Cyp4a12a	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a (Cyp4a12a), mRNA
0.0217	2.06	100040774	Gm2960	PREDICTED: similar to vesicle-associated membrane protein 8 (LOC100045310), mRNA
0.0000	2.07	94090	Trim9	tripartite motif-containing 9 (Trim9), transcript variant 1, mRNA
0.0128	2.07	67585	4930455J16Rik	adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4932418C03 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0182	2.07	75645	1700011F14Rik	RIKEN cDNA 1700011F14 gene (1700011F14Rik), mRNA
0.0002	2.07	28253	Slco1b2	solute carrier organic anion transporter family, member 1b2 (Slco1b2), transcript variant 1, mRNA
0.0000	2.07	71217	4933431I19Rik	adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4933431I19 product:weakly similar to OLFACTORY RECEPTOR MOR184-6, full insert sequence.
0.0007	2.07	383563	Gpr25	G protein-coupled receptor 25 (Gpr25), mRNA
0.0000	2.07	12326	Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (Camk4), mRNA
0.0001	2.07	12401	Serpina6	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6 (Serpina6), mRNA
0.0089	2.08	68775	Atp6v1c2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit C2 (Atp6v1c2), transcript variant 2, mRNA
0.0406	2.08	622127	Cyp3a57	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 57 (Cyp3a57), mRNA
0.0076	2.08	26875	Pclo	piccolo (presynaptic cytomatrix protein) (Pclo), transcript variant 2, mRNA
0.0483	2.08	78552	E130201H02Rik	RIKEN cDNA E130201H02 gene (E130201H02Rik), non-coding RNA
0.0017	2.08	433633	Gm5545	PREDICTED: predicted gene, EG433633 (EG433633), mRNA
0.0038	2.08	228942	CbIn4	cerebellin 4 precursor protein (CbIn4), mRNA
0.0004	2.08	22784	Slc30a3	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3 (Slc30a3), mRNA
0.0147	2.08	212516	BC060267	cDNA sequence BC060267 (BC060267), mRNA
0.0003	2.08	50500	Ttpa	tocopherol (alpha) transfer protein (Ttpa), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0000	2.09	170812	Ahsp	alpha hemoglobin stabilizing protein (Ahsp), mRNA
0.0476	2.09	100048852	LOC100048852	PREDICTED: similar to phospholipase A2, group V (LOC100048852), mRNA
0.0043	2.09	434729	Gm5635	predicted gene 5635 (Gm5635), mRNA
0.0047	2.09	170813	Ms4a3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (Ms4a3), mRNA
0.0064	2.09	100042875	Gm12059	PREDICTED: hypothetical protein LOC100046833 (LOC100046833), mRNA
0.0305	2.09	27409	Abcg5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5 (Abcg5), mRNA
0.0000	2.09	75512	Gpx6	glutathione peroxidase 6 (Gpx6), mRNA
0.0008	2.09	11720	Mat1a	methionine adenosyltransferase I, alpha (Mat1a), mRNA
0.0009	2.10	75396	Spp2	secreted phosphoprotein 2 (Spp2), mRNA
0.0002	2.10	75104	Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2), mRNA
0.0000	2.10	14073	Faah	fatty acid amide hydrolase (Faah), mRNA
0.0000	2.10	16644	Kng1	kininogen 1 (Kng1), transcript variant 1, mRNA
0.0001	2.11	11818	Apoh	apolipoprotein H (Apoh), mRNA
0.0202	2.11	213248	Wdr49	PREDICTED: WD repeat domain 49 (Wdr49), mRNA
0.0060	2.11	20981	Syt3	synaptotagmin III (Syt3), transcript variant 1, mRNA
0.0001	2.11	18946	Pnliprp1	pancreatic lipase related protein 1 (Pnliprp1), mRNA
0.0000	2.11	15007	H2-Q10	histocompatibility 2, Q region locus 10 (H2-Q10), mRNA
0.0000	2.11	12116	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase (Bhmt), mRNA
0.0010	2.11	18705	Pik3c2g	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide (Pik3c2g), transcript variant 1, mRNA
0.0134	2.11	13197	Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (Gadd45a), mRNA
0.0005	2.11	18534	Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic (Pck1), mRNA
0.0021	2.11	100042539	Gm3893	predicted gene 3893 (Gm3893), non-coding RNA
0.0010	2.11	72058	Igsf5	immunoglobulin superfamily, member 5 (Igsf5), transcript variant 1, mRNA
0.0002	2.11	15490	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7 (Hsd17b7), mRNA
0.0002	2.11	106648	Cyp4f15	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15 (Cyp4f15), mRNA
0.0023	2.12	22239	Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A (Ugt8a), mRNA
0.0255	2.12	381101	BC048355	cDNA sequence BC048355 (BC048355), mRNA
0.0026	2.12	207921	A830093I24Rik	RIKEN cDNA A830093I24 gene (A830093I24Rik), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0012	2.12	30060	Mfi2	antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5 (Mfi2), mRNA
0.0000	2.12	109791	Clps	colipase, pancreatic (Clps), mRNA
0.0000	2.12	16426	Itih3	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3 (Itih3), mRNA
0.0113	2.12	319942	A530016L24Rik	RIKEN cDNA A530016L24 gene (A530016L24Rik), mRNA
0.0182	2.12	77782	Polq	polymerase (DNA directed), theta (Polq), transcript variant 1, mRNA
0.0068	2.13	100043482	Gm4469	PREDICTED: similar to Moca-cyp CG1866-PB (LOC100048213), mRNA
0.0008	2.13	768252	Foxl2os	forkhead box L2 opposite strand transcript (Foxl2os), non-coding RNA
0.0116	2.13	474145	Clec4a4	C-type lectin domain family 4, member a4 (Clec4a4), mRNA
0.0098	2.13	545136	Fam186b	family with sequence similarity 186, member B (Fam186b), mRNA
0.0083	2.14	636931	Trim71	tripartite motif-containing 71 (Trim71), mRNA
0.0119	2.14	217600	Rpl26-ps2	PREDICTED: predicted gene, EG217600 (EG217600), mRNA
0.0148	2.14	14087	Fanca	Fanconi anemia, complementation group A (Fanca), mRNA
0.0115	2.14	100039504	Gm2275	PREDICTED: hypothetical protein LOC100039504 (LOC100039504), mRNA
0.0041	2.14	330554	Mtmr15	myotubularin related protein 15 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:3045266]
0.0234	2.14	18241	Gpr143	G protein-coupled receptor 143 (Gpr143), mRNA
0.0313	2.14	268859	A2bp1	ataxin 2 binding protein 1 (A2bp1), transcript variant 2, mRNA
0.0046	2.15	544963	Iqgap2	IQ motif containing GTPase activating protein 2 (Iqgap2), mRNA
0.0027	2.15	105283	E030046B03Rik	0 day neonate lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E030046B03 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0007	2.15	259103	Olfr616	olfactory receptor 616 (Olfr616), mRNA
0.0131	2.15	107869	Cth	cystathionase (cystathionine gamma-lyase) (Cth), mRNA
0.0042	2.15	107869	Cth	cystathionase (cystathionine gamma-lyase) (Cth), mRNA
0.0053	2.15	73806	4930406D18Rik	BY714637 RIKEN full-length enriched, adult male testis cDNA clone 4930406D18 5'
0.0073	2.15	100044744	LOC100044744	PREDICTED: hypothetical protein LOC100044744 (LOC100044744), mRNA
0.0000	2.15	238055	Apob	apolipoprotein B (Apob), mRNA
0.0373	2.15	320873	Cdh10	cadherin 10 (Cdh10), mRNA
0.0000	2.16	20700	Serpina1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A (Serpina1a), mRNA
0.0069	2.16	21684	Tectb	tectorin beta (Tectb), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0113	2.16	67902	Sumf2	sulfatase modifying factor 2 (Sumf2), mRNA
0.0003	2.16	76380	Ccdc46	coiled-coil domain containing 46 (Ccdc46), transcript variant 2, mRNA
0.0033	2.16	195208	Dcdc2a	doublecortin domain containing 2a (Dcdc2a), mRNA
0.0149	2.17	574415	Gm6042	predicted gene 6042 (Gm6042), non-coding RNA
0.0061	2.17	73489	1700080N15Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 1700080N15 gene (1700080N15Rik), mRNA
0.0068	2.17	100047162	LOC100047162	PREDICTED: similar to immunoglobulin kappa-chain (LOC100047162), mRNA
0.0030	2.18	71691	Pnmal1	PNMA-like 1 (Pnmal1), mRNA
0.0093	2.18	73671	Sult6b1	sulfotransferase family, cytosolic, 6B, member 1 (Sult6b1), mRNA
0.0091	2.18	100040353	2810416G20Rik	PREDICTED: similar to splicing coactivator subunit SRm300 (LOC100040353), mRNA
0.0002	2.18	20209	Saa2	serum amyloid A 2 (Saa2), mRNA
0.0300	2.18	14120	Fbp2	fructose biphosphatase 2 (Fbp2), mRNA
0.0006	2.19	13124	Cyp8b1	cytochrome P450, family 8, subfamily b, polypeptide 1 (Cyp8b1), mRNA
0.0013	2.19	66283	Gkn1	gastrokine 1 (Gkn1), mRNA
0.0445	2.19	75299	4930547M16Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4930547M16 gene, transcript variant 2 (4930547M16Rik), mRNA
0.0016	2.19	68214	Gsto2	glutathione S-transferase omega 2 (Gsto2), mRNA
0.0165	2.19	22229	Ucp3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0003	2.19	67412	6330407J23Rik	RIKEN cDNA 6330407J23 gene (6330407J23Rik), mRNA
0.0139	2.20	226999	Slc9a2	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 2 (Slc9a2), mRNA
0.0001	2.20	93673	Cml2	camello-like 2 (Cml2), mRNA
0.0367	2.20	72785	2810474C18Rik	RIKEN cDNA 2810474C18 gene Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1920035]
0.0000	2.20	406218	Panx2	pannexin 2 (Panx2), mRNA
0.0004	2.21	338352	Nell1	NEL-like 1 (chicken) (Nell1), mRNA
0.0000	2.21	23934	Ly6h	lymphocyte antigen 6 complex, locus H (Ly6h), transcript variant 1, mRNA
0.0000	2.21	93688	Klhl1	kelch-like 1 (Drosophila) (Klhl1), mRNA
0.0048	2.21	66805	Tspan1	tetraspanin 1 (Tspan1), mRNA
0.0020	2.21	74020	Cpne4	copine IV (Cpne4), mRNA
0.0147	2.21	11833	Aqp8	aquaporin 8 (Aqp8), transcript variant 1, mRNA
0.0001	2.21	15490	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7 (Hsd17b7), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0011	2.21	435651	Gm5705	PREDICTED: similar to oocyte-specific eukaryotic translation initiation factor 4E-like (LOC435651), misc RNA
0.0445	2.22	319991	Kif6	kinesin family member 6 (Kif6), mRNA
0.0016	2.22	73332	Ccdc30	coiled-coil domain containing 30 (Ccdc30), mRNA
0.0004	2.22	84506	Hamp	hepcidin antimicrobial peptide (Hamp), mRNA
0.0298	2.22	16763	Lad1	ladinin (Lad1), mRNA
0.0000	2.23	18815	Plg	plasminogen (Plg), mRNA
0.0027	2.23	96915	C85403	DS006B_A05 Eppig
0.0021	2.23	338521	Fa2h	fatty acid 2-hydroxylase (Fa2h), mRNA
0.0011	2.24	12647	Chat	choline acetyltransferase (Chat), mRNA
0.0124	2.24	67133	Gp2	glycoprotein 2 (zymogen granule membrane) (Gp2), mRNA
0.0268	2.24	78739	9530062K07Rik	adult male urinary bladder cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9530062K07 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0003	2.24	98870	AI182371	expressed sequence AI182371 (AI182371), mRNA
0.0016	2.24	228792	7530422B04Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 7530422B04 gene (7530422B04Rik), mRNA
0.0005	2.24	22678	Zfp2	zinc finger protein 2 (Zfp2), transcript variant 3, mRNA
0.0007	2.24	100046344	LOC100046344	PREDICTED: similar to Nucleoside diphosphate kinase A (NDK A) (NDP kinase A) (Tumor metastatic process-associated protein) (Metastasis inhibition factor NM23) (NDPK-A) (nm23-M1) (LOC100046344), mRNA
0.0000	2.24	243339	Tmem130	transmembrane protein 130 (Tmem130), mRNA
0.0018	2.25	13142	Dao	D-amino acid oxidase (Dao), mRNA
0.0002	2.25	83702	Akr1c6	aldo-keto reductase family 1, member C6 (Akr1c6), mRNA
0.0003	2.26	666021	2300003K06Rik	PREDICTED: similar to novel member of the keratin associated protein 4 (Krtap4) family (LOC666021), mRNA
0.0054	2.26	211945	Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1 (Plekhh1), mRNA
0.0482	2.26	80906	Kcnip2	Kv channel-interacting protein 2 (Kcnip2), transcript variant a, mRNA
0.0008	2.27	80877	Lrba	LPS-responsive beige-like anchor (Lrba), transcript variant 2, mRNA
0.0061	2.27	100042198	Gm3716	PREDICTED: hypothetical protein LOC100047135 (LOC100047135), mRNA
0.0189	2.27	235135	Tmem45b	transmembrane protein 45b (Tmem45b), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0212	2.27	69489	2310007J06Rik	adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2310007J06 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0001	2.27	640684	LOC640684	PREDICTED: similar to keratin associated protein 16-4 (LOC640684), mRNA
0.0007	2.27	100048685	LOC100048685	PREDICTED: similar to tetratricopeptide repeat domain 32 (LOC100048685), misc RNA
0.0017	2.27	319684	5031425F14Rik	melanocyte cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G270128K17 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0001	2.27	22598	Slc6a18	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 18 (Slc6a18), transcript variant 1, mRNA
0.0089	2.27	67620	Lrp2bp	Lrp2 binding protein (Lrp2bp), mRNA
0.0005	2.27	13706	Cela2a	chymotrypsin-like elastase family, member 2A (Cela2a), mRNA
0.0424	2.27	268481	Krt222	keratin 222 (Krt222), mRNA
0.0036	2.28	12589	Ift81	intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas) (Ift81), mRNA
0.0007	2.28	321018	Serpina4-ps1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 4, pseudogene 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:5123840).
0.0003	2.28	13395	Dlx5	distal-less homeobox 5 (Dlx5), transcript variant 1, mRNA
0.0099	2.28	233836	Slc5a11	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11 (Slc5a11), mRNA
0.0009	2.28	74020	Cpne4	copine IV (Cpne4), mRNA
0.0013	2.29	74446	Nhedc1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger domain containing 1 (Nhedc1), mRNA
0.0213	2.29	75263	4930551O13Rik	adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930551O13 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0199	2.29	12561	Cdh4	cadherin 4 (Cdh4), mRNA
0.0140	2.29	207921	A830093I24Rik	RIKEN cDNA A830093I24 gene (A830093I24Rik), mRNA
0.0001	2.30	225998	Rorb	RAR-related orphan receptor beta (Rorb), transcript variant 1, mRNA
0.0266	2.30	170761	Pdzd3	PDZ domain containing 3 (Pdzd3), mRNA
0.0009	2.30	77609	Ccdc151	coiled-coil domain containing 151 (Ccdc151), transcript variant 1, mRNA
0.0000	2.30	382053	Es31	esterase 31 (Es31), transcript variant 1, mRNA
0.0122	2.30	193003	Pirt	phosphoinositide-interacting regulator of transient receptor potential channels (Pirt), mRNA
0.0001	2.30	14580	Gfap	glial fibrillary acidic protein (Gfap), transcript variant 2, mRNA
0.0190	2.31	12386	Ctnna2	catenin (cadherin associated protein), alpha 2 (Ctnna2), transcript variant 3, mRNA
0.0020	2.31	52144	D7Ertd661e	H3085D11-3 NIA Mouse 15K cDNA Clone Set cDNA clone H3085D11 3', mRNA sequence

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0014	2.31	71275	4933437F05Rik	RIKEN cDNA 4933437F05 gene (4933437F05Rik), mRNA
0.0025	2.31	194612	Gm9805	PREDICTED: predicted gene, ENSMUSG00000046088 (ENSMUSG00000046088), mRNA
0.0000	2.32	18405	Orm1	orosomucoid 1 (Orm1), mRNA
0.0264	2.32	240667	Sec31b	Sec31 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (Sec31b), mRNA
0.0338	2.32	73335	1700047K16Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 1700047K16 gene (1700047K16Rik), mRNA
0.0000	2.32	103964	Try5	trypsin 5 (Try5), mRNA
0.0000	2.32	217847	Serpina10	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 10 (Serpina10), mRNA
0.0000	2.33	11516	Adcyap1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 (Adcyap1), mRNA
0.0001	2.33	100047053	LOC100047053	PREDICTED: similar to monoclonal antibody kappa light chain (LOC100047053), mRNA
0.0020	2.33	245615	Kir3dl2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 (Kir3dl2), mRNA
0.0000	2.34	20704	Serpina1e	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1E (Serpina1e), mRNA
0.0054	2.34	75355	4930553P18Rik	adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930553P18 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0000	2.34	11905	Serpinc1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1 (Serpinc1), mRNA
0.0001	2.34	11552	Adra2b	adrenergic receptor, alpha 2b (Adra2b), mRNA
0.0128	2.35	244417	Gm501	PREDICTED: gene model 501, (NCBI) (Gm501), mRNA
0.0001	2.35	76294	Asb5	ankyrin repeat and SOC's box-containing 5 (Asb5), mRNA
0.0062	2.36	103149	Upb1	ureidopropionase, beta (Upb1), mRNA
0.0120	2.36	353287	Clec18a	C-type lectin domain family 18, member A (Clec18a), mRNA
0.0197	2.36	100041781	Gm3510	PREDICTED: hypothetical protein LOC100046507 (LOC100046507), mRNA
0.0000	2.36	12269	C4bp	complement component 4 binding protein (C4bp), mRNA
0.0014	2.37	381418	Ctxn2	cortexin 2 (Ctxn2), mRNA
0.0000	2.37	15572	Elavl4	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i>)-like 4 (Hu antigen D) (Elavl4), transcript variant 1, mRNA
0.0099	2.37	78923	Chsy3	chondroitin sulfate synthase 3 (Chsy3), mRNA
0.0000	2.37	14473	Gc	group specific component (Gc), mRNA
0.0019	2.37	212190	Ubxn10	UBX domain protein 10 (Ubxn10), mRNA
0.0352	2.38	16420	Itgb6	integrin beta 6 (Itgb6), transcript variant 2, mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0014	2.38	71724	Aox3	aldehyde oxidase 3 (Aox3), mRNA
0.0018	2.38	259301	Leap2	liver-expressed antimicrobial peptide 2 (Leap2), mRNA
0.0190	2.38	76797	2410137M14Rik	RIKEN cDNA 2410137M14 gene (2410137M14Rik), mRNA
0.0002	2.38	12944	Crp	C-reactive protein, pentraxin-related (Crp), mRNA
0.0002	2.39	18191	Nrxn3	neurexin III (Nrxn3), mRNA
0.0007	2.39	14680	Gnal	guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating, olfactory type (Gnal), transcript variant 2, mRNA
0.0002	2.40	74088	0610012H03Rik	RIKEN cDNA 0610012H03 gene (0610012H03Rik), transcript variant 1, mRNA
0.0015	2.40	330790	Hapln4	hyaluronan and proteoglycan link protein 4 (Hapln4), mRNA
0.0129	2.40	213006	Mfsd4	major facilitator superfamily domain containing 4 (Mfsd4), transcript variant b, mRNA
0.0253	2.41	75172	Ccdc146	coiled-coil domain containing 146 (Ccdc146), mRNA
0.0002	2.41	75116	4930520O04Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4930520O04 gene (4930520O04Rik), mRNA
0.0326	2.41	11304	Abca4	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4 (Abca4), mRNA
0.0379	2.42	100042314	Gm10639	predicted gene 10639 (Gm10639), mRNA
0.0058	2.42	19417	Rasgrf1	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 (Rasgrf1), transcript variant 1, mRNA
0.0007	2.42	23964	Odz2	odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila) (Odz2), mRNA
0.0126	2.42	432958	LOC432958	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630042D17 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0036	2.43	100048139	LOC100048139	PREDICTED: similar to hypothetical protein (LOC100048139), mRNA
0.0003	2.44	71685	Galnt14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (Galnt14), mRNA
0.0039	2.44	73932	4930406M16Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4930406M16 gene (4930406M16Rik), mRNA
0.0097	2.44	665296	Gm7575	PREDICTED: similar to PHD finger protein 14 (LOC665296), misc RNA
0.0184	2.45	268859	A2bp1	ataxin 2 binding protein 1 (A2bp1), transcript variant 2, mRNA
0.0006	2.45	12738	Cldn2	claudin 2 (Cldn2), mRNA
0.0121	2.45	108995	Tbc1d10c	TBC1 domain family, member 10c (Tbc1d10c), mRNA
0.0063	2.45	78580	D730003K21Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA D730003K21 gene (D730003K21Rik), mRNA
0.0000	2.46	94175	Hrg	histidine-rich glycoprotein (Hrg), mRNA
0.0378	2.46	56839	Lgi1	leucine-rich repeat LGI family, member 1 (Lgi1), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0000	2.46	13097	Cyp2c38	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38 (Cyp2c38), mRNA
0.0019	2.47	100039047	Gm2018	PREDICTED: hypothetical protein LOC100039047 (LOC100039047), mRNA
0.0206	2.47	233231	Mrgprb1	MAS-related GPR, member B1 (Mrgprb1), mRNA
0.0003	2.47	227231	Cps1	carbamoyl-phosphate synthetase 1 (Cps1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0082	2.47	382301	Sly	Sycp3 like Y-linked (Sly), mRNA
0.0000	2.47	71775	1300017J02Rik	RIKEN cDNA 1300017J02 gene (1300017J02Rik), mRNA
0.0000	2.48	13095	Cyp2c29	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29 (Cyp2c29), mRNA
0.0000	2.48	382044	Gm5158	predicted gene 5158 (Gm5158), mRNA
0.0000	2.48	114228	Prss1	protease, serine, 1 (trypsin 1) (Prss1), mRNA
0.0482	2.48	11514	Adcy8	adenylate cyclase 8 (Adcy8), mRNA
0.0031	2.48	17171	Mas1	MAS1 oncogene (Mas1), mRNA
0.0075	2.48	75576	1700030L22Rik	AGENCOURT_10614464 NIH_MGC_169 cDNA clone IMAGE:6742639 5', mRNA sequence
0.0063	2.48	114872	Psg29	pregnancy-specific glycoprotein 29 (Psg29), mRNA
0.0103	2.49	233826	Palb2	partner and localizer of BRCA2 (Palb2), mRNA
0.0004	2.49	210274	Shank2	SH3/ankyrin domain gene 2 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:2671987]
0.0127	2.50	547168	Rhox7	reproductive homeobox 7 (Rhox7), mRNA
0.0001	2.50	13089	Cyp2b13	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 13 (Cyp2b13), mRNA
0.0000	2.50	99571	Fgg	fibrinogen gamma chain (Fgg), mRNA
0.0176	2.50	214084	Slc18a2	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2 (Slc18a2), mRNA
0.0026	2.51	20871	Aurkc	aurora kinase C (Aurkc), transcript variant 2, mRNA
0.0353	2.51	106407	Osta	organic solute transporter alpha (Osta), mRNA
0.0040	2.51	100045026	LOC100045026	butyrophilin-like (LOC100045026), mRNA
0.0007	2.51	12426	Cckbr	cholecystokinin B receptor (Cckbr), mRNA
0.0134	2.53	70157	2210409D07Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2210409D07 gene (2210409D07Rik), mRNA
0.0204	2.53	19716	Bex1	brain expressed gene 1 (Bex1), mRNA
0.0095	2.54	71760	Agxt2l1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 (Agxt2l1), transcript variant 1, mRNA
0.0041	2.54	67795	Rnls	renalase, FAD-dependent amine oxidase (Rnls), transcript variant 1, mRNA
0.0077	2.55	12292	Cacna1s	Ca ²⁺ channel, voltage-dependent, L type, α 1S subunit (Cacna1s), transcript variant 2, mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0000	2.55	230558	C8a	complement component 8, alpha polypeptide (C8a), mRNA
0.0006	2.56	404330	Olfr1198	olfactory receptor 1198 (Olfr1198), mRNA
0.0147	2.57	12292	Cacna1s	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit (Cacna1s), transcript variant 2, mRNA
0.0003	2.58	54698	Crtam	cytotoxic and regulatory T cell molecule (Crtam), mRNA
0.0008	2.58	20451	St8sia3	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3 (St8sia3), mRNA
0.0398	2.59	240595	Kcnv2	potassium channel, subfamily V, member 2 (Kcnv2), mRNA
0.0001	2.59	16596	Klf1	Kruppel-like factor 1 (erythroid) (Klf1), mRNA
0.0069	2.59	16420	Itgb6	integrin beta 6 (Itgb6), transcript variant 2, mRNA
0.0001	2.61	14161	Fga	fibrinogen alpha chain (Fga), transcript variant 2, mRNA
0.0364	2.61	11833	Aqp8	aquaporin 8 (Aqp8), transcript variant 1, mRNA
0.0000	2.61	545288	Cyp2c67	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 67 (Cyp2c67), mRNA
0.0000	2.61	234199	Fgl1	fibrinogen-like protein 1 (Fgl1), mRNA
0.0079	2.62	217874	BC048943	cDNA sequence BC048943 (BC048943), mRNA
0.0000	2.62	385643	Kng2	kininogen 2 (Kng2), transcript variant 1, mRNA
0.0000	2.62	11807	Apoa2	apolipoprotein A-II (Apoa2), mRNA
0.0001	2.62	98303	D630023F18Rik	RIKEN cDNA D630023F18 gene (D630023F18Rik), mRNA
0.0000	2.63	20714	Serpina3k	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K (Serpina3k), mRNA
0.0000	2.63	319776	Tmem72	transmembrane protein 72 (Tmem72), mRNA
0.0035	2.64	93969	Klra22	killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 22 (Klra22), mRNA
0.0290	2.64	329934	Foxo6	forkhead box O6 (Foxo6), mRNA
0.0000	2.65	234199	Fgl1	fibrinogen-like protein 1 (Fgl1), mRNA
0.0340	2.65	109254	9530008L14Rik	RIKEN cDNA 9530008L14 gene (9530008L14Rik), transcript variant 2, mRNA
0.0001	2.65	19144	Klk6	kallikrein related-peptidase 6 (Klk6), transcript variant 1, mRNA
0.0004	2.67	12386	Ctnna2	catenin (cadherin associated protein), alpha 2 (Ctnna2), transcript variant 2, mRNA
0.0004	2.67	381724	BC061212	cDNA sequence BC061212 (BC061212), mRNA
0.0425	2.67	14695	Gnb3	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3 (Gnb3), mRNA
0.0002	2.68	22771	Zic1	zinc finger protein of the cerebellum 1 (Zic1), mRNA
0.0244	2.68	619326	9130409I23Rik	RIKEN cDNA 9130409I23 gene (9130409I23Rik), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0154	2.69	64176	Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2 b (Sv2b), transcript variant 1, mRNA
0.0000	2.69	100189605	LOC100189605	major urinary protein 17 (LOC100189605), mRNA
0.0290	2.69	77469	C030034E14Rik	NMA06909 Lateral Ventricle Wall C57BL
0.0014	2.70	65079	Rtn4r	reticulon 4 receptor (Rtn4r), mRNA
0.0025	2.70	100047443	LOC100047443	PREDICTED: similar to Gamma-aminobutyric-acid receptor subunit alpha-2 precursor (GABA(A) receptor subunit alpha-2) (LOC100047443), mRNA
0.0302	2.71	13168	Dbil5	diazepam binding inhibitor-like 5 (Dbil5), mRNA
0.0009	2.73	100044098	LOC100044098	PREDICTED: similar to UCH37-interacting protein 1 (LOC100044098), mRNA
0.0036	2.73	100048604	LOC100048604	ninjurin 2 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:1352751]
0.0102	2.73	260299	Cadm4	cell adhesion molecule 4 (Cadm4), mRNA
0.0057	2.73	328265	A530001N23Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA A530001N23 gene (A530001N23Rik), mRNA
0.0001	2.74	664859	Gm7373	PREDICTED: similar to elongin A (LOC634484), mRNA
0.0007	2.74	666168	Cyp4a31	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 31 (Cyp4a31), mRNA
0.0107	2.74	55987	Cpxm2	carboxypeptidase X 2 (M14 family) (Cpxm2), mRNA
0.0000	2.75	632000	Gm7078	PREDICTED: similar to CG4090-PA (LOC632000), misc RNA
0.0077	2.76	56410	Cbln3	cerebellin 3 precursor protein (Cbln3), mRNA
0.0010	2.76	13096	Cyp2c37	cytochrome P450, family 2. subfamily c, polypeptide 37 (Cyp2c37), mRNA
0.0059	2.76	791359	Gm9961	predicted gene 9961 (Gm9961), non-coding RNA
0.0000	2.77	20703	Serpina1d	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1D (Serpina1d), mRNA
0.0130	2.78	213402	Armc2	armadillo repeat containing 2 (Armc2), mRNA
0.0001	2.79	56720	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase (Tdo2), mRNA
0.0005	2.79	100044708	LOC100044708	PREDICTED: similar to transcription factor Math5 (LOC100044708), mRNA
0.0000	2.80	100048885	LOC100048885	major urinary protein LOC100048885 (LOC100048885), mRNA
0.0472	2.80	238564	Mylk4	myosin light chain kinase family, member 4 (Mylk4), mRNA
0.0000	2.81	258458	Olfr165	olfactory receptor 165 (Olfr165), mRNA
0.0002	2.81	13114	Cyp3a16	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16 (Cyp3a16), mRNA
0.0001	2.82	208213	Tmem132c	transmembrane protein 132C (Tmem132c), mRNA
0.0015	2.83	666481	Gm8126	PREDICTED: hypothetical LOC666481 (LOC666481), misc RNA
0.0002	2.84	258281	Olfr780	olfactory receptor 780 (Olfr780), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0000	2.85	11287	Pzp	pregnancy zone protein (Pzp), mRNA
0.0000	2.86	17842	Mup3	major urinary protein 3 (Mup3), mRNA
0.0010	2.86	627871	Gm6802	PREDICTED: predicted gene, EG627871 (EG627871), misc RNA
0.0072	2.87	19716	Bex1	brain expressed gene 1 (Bex1), mRNA
0.0023	2.87	83672	Sytl3	synaptotagmin-like 3 (Sytl3), transcript variant 1, mRNA
0.0095	2.87	53871	Pkd2l2	polycystic kidney disease 2-like 2 (Pkd2l2), transcript variant 1, mRNA
0.0008	2.87	22300	Vmn2r123	vomeroneasal 2, receptor 123 (Vmn2r123), mRNA
0.0074	2.90	68314	0610008F07Rik	RIKEN cDNA 0610008F07 gene (0610008F07Rik), non-coding RNA
0.0000	2.90	13884	Es1	esterase 1 (Es1), mRNA
0.0382	2.91	19892	Rpe65	retinal pigment epithelium 65 (Rpe65), mRNA
0.0015	2.92	74545	9030417H13Rik	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130034L04 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0464	2.92	13206	Ddx4	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (Ddx4), transcript variant 2, mRNA
0.0307	2.92	104158	Ces3	carboxylesterase 3 (Ces3), mRNA
0.0043	2.93	319572	C730027H18Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA C730027H18 gene (C730027H18Rik), mRNA
0.0006	2.93	71213	Cage1	cancer antigen 1 (Cage1), mRNA
0.0388	2.94	76186	6330563C09Rik	adult male corpus striatum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C030034A15 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0080	2.94	211329	Ncoa7	nuclear receptor coactivator 7 (Ncoa7), transcript variant 1, mRNA
0.0120	2.94	407824	BC020402	cDNA sequence BC020402 (BC020402), non-coding RNA
0.0163	2.94	77414	C030013G03Rik	adult male corpus striatum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C030013G03 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0000	2.96	76703	Cpb1	carboxypeptidase B1 (tissue) (Cpb1), mRNA
0.0097	2.96	100047337	LOC100047337	PREDICTED: hypothetical protein LOC100047337 (LOC100047337), mRNA
0.0012	2.96	622523	Gm6329	PREDICTED: predicted gene, EG622523 (EG622523), mRNA
0.0002	2.97	11889	Asgr1	asialoglycoprotein receptor 1 (Asgr1), mRNA
0.0069	2.97	72267	Lrrc8e	leucine rich repeat containing 8 family, member E (Lrrc8e), mRNA
0.0465	2.97	15165	Hcn1	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1 (Hcn1), mRNA
0.0000	2.98	70129	Slc44a4	solute carrier family 44, member 4 (Slc44a4), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0025	2.99	11808	Apoa4	apolipoprotein A-IV (Apoa4), mRNA
0.0021	2.99	666385	Gm8075	PREDICTED: predicted gene, EG666385 (EG666385), mRNA
0.0015	3.00	56710	Dbc1	deleted in bladder cancer 1 (human) (Dbc1), mRNA
0.0012	3.04	268354	Fam19a2	family with sequence similarity 19, member A2 (Fam19a2), mRNA
0.0034	3.05	622494	Gm6325	PREDICTED: hypothetical LOC622494 (LOC622494), misc RNA
0.0095	3.05	18781	Pla2g2c	phospholipase A2, group IIC (Pla2g2c), mRNA
0.0046	3.05	76974	1190003J15Rik	RIKEN cDNA 1190003J15 gene (1190003J15Rik), mRNA
0.0000	3.07	20493	Slc10a1	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1 (Slc10a1), transcript variant 2, mRNA
0.0003	3.10	630751	LOC630751	PREDICTED: hypothetical LOC630751 (LOC630751), misc RNA
0.0001	3.12	16006	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1), mRNA
0.0147	3.12	20739	Spna1	spectrin alpha 1 (Spna1), mRNA
0.0000	3.15	243168	Hsd17b13	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13 (Hsd17b13), transcript variant 1, mRNA
0.0002	3.16	11419	Accn2	amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal (Accn2), mRNA
0.0318	3.17	319807	3110047P20Rik	RIKEN cDNA 3110047P20 gene (3110047P20Rik), mRNA
0.0002	3.18	226180	Ina	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:96568]
0.0010	3.19	214973	Gm11349	PREDICTED: similar to peptidylprolyl isomerase D (LOC214973), misc RNA
0.0000	3.24	28194	Apon	apolipoprotein N (Apon), mRNA
0.0000	3.26	12788	Cnga1	cyclic nucleotide gated channel alpha 1 (Cnga1), mRNA
0.0007	3.28	110382	C8b	complement component 8, beta polypeptide (C8b), mRNA
0.0100	3.28	100042314	Gm10639	predicted gene 10639 (Gm10639), mRNA
0.0000	3.28	241919	Slc7a14	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 14 (Slc7a14), mRNA
0.0000	3.29	234199	Fgl1	fibrinogen-like protein 1, mRNA (cDNA clone MGC:25810 IMAGE:4158843), complete cds.
0.0181	3.30	319415	Hs3st5	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5 (Hs3st5), mRNA
0.0000	3.31	13117	Cyp4a10	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10 (Cyp4a10), mRNA
0.0098	3.32	16847	Lepr	leptin receptor (Lepr), transcript variant 3, mRNA
0.0005	3.32	14619	Gjb2	gap junction protein, beta 2 (Gjb2), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0000	3.33	381091	H2-Eb2	histocompatibility 2, class II antigen E beta2 (H2-Eb2), mRNA
0.0011	3.36	623312	Gm6416	PREDICTED: hypothetical protein LOC623312 (LOC623312), mRNA
0.0001	3.38	18979	Pon1	paraoxonase 1 (Pon1), mRNA
0.0042	3.40	216166	Plk5	polo-like kinase 5 (Drosophila) (Plk5), mRNA
0.0003	3.41	15228	Foxg1	forkhead box G1 (Foxg1), transcript variant 2, mRNA
0.0000	3.43	80976	Syt13	synaptotagmin XIII (Syt13), mRNA
0.0000	3.43	100043781	Gm4643	PREDICTED: hypothetical protein LOC100048711 (LOC100048711), mRNA
0.0028	3.43	73898	4930429E23Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4930429E23 gene (4930429E23Rik), mRNA
0.0006	3.50	20211	Saa4	serum amyloid A 4 (Saa4), mRNA
0.0086	3.56	20519	Slc22a3	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3 (Slc22a3), mRNA
0.0114	3.57	246700	Defb19	defensin beta 19 (Defb19), mRNA
0.0107	3.62	17171	Mas1	MAS1 oncogene (Mas1), mRNA
0.0024	3.65	626870	Gm11992	predicted gene 11992 (Gm11992), mRNA
0.0142	3.72	71037	Prss55	protease, serine, 55 (Prss55), mRNA
0.0000	3.73	14161	Fga	fibrinogen alpha chain (Fga), transcript variant 2, mRNA
0.0002	3.77	100041449	Cyp3a59	cytochrome P450, subfamily 3A, polypeptide 59 (Cyp3a59), mRNA
0.0038	3.81	213402	Armc2	armadillo repeat containing 2 (Armc2), mRNA
0.0000	3.81	14415	Gad1	glutamic acid decarboxylase 1 (Gad1), mRNA
0.0104	3.89	100041290	D4Ertd617e	DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 617, expressed (D4Ertd617e), non-coding RNA
0.0000	3.91	676193	LOC676193	PREDICTED: similar to anti-A/U antibody (LOC676193), mRNA
0.0000	3.96	11438	Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4 (Chrna4), mRNA
0.0035	3.97	208634	Tspan10	tetraspanin 10 (Tspan10), mRNA
0.0021	4.07	272158	Poln	DNA polymerase N (Poln), mRNA
0.0007	4.07	381530	Mup20	major urinary protein 20 (Mup20), mRNA
0.0008	4.20	210321	BC048679	cDNA sequence BC048679 (BC048679), mRNA
0.0000	4.28	12733	Clcnka	chloride channel Ka (Clcnka), transcript variant 1, mRNA
0.0001	4.28	227325	Dner	delta/notch-like EGF-related receptor (Dner), mRNA
0.0000	4.29	667314	Gm8570	PREDICTED: predicted gene, EG667314 (EG667314), mRNA
0.0052	4.50	194974	Sun3	Sad1 and UNC84 domain containing 3 (Sun3), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Down-regulated genes

0.0009	4.90	100043817	Gm4668	PREDICTED: hypothetical protein LOC100043817 (LOC100043817), mRNA
0.0000	4.95	404195	Cyp2c54	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 54 (Cyp2c54), mRNA
0.0026	4.96	100045752	LOC100045752	PREDICTED: hypothetical protein LOC100045752 (LOC100045752), mRNA
0.0000	5.20	13112	Cyp3a11	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11 (Cyp3a11), mRNA
0.0153	5.24	399548	Scn4b	sodium channel, type IV, beta (Scn4b), mRNA
0.0000	5.43	103161	Apof	apolipoprotein F (Apof), mRNA
0.0021	5.79	19352	Rabggtb	RAB geranylgeranyl transferase, b subunit (Rabggtb), transcript variant 1, mRNA
0.0166	5.93	56839	Lgi1	leucine-rich repeat LGI family, member 1 (Lgi1), mRNA
0.0014	6.86	432777	D630045M09Rik	ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2410071D21 product:similar to LRRGT00034 [Rattus norvegicus], full insert sequence.
0.0000	7.92	100038948	Mup9	major urinary protein 9 (Mup9), mRNA
0.0052	8.81	104362	Meig1	meiosis expressed gene 1 (Meig1), mRNA
0.0089	9.41	104362	Meig1	meiosis expressed gene 1 (Meig1), mRNA

Up-regulated genes

0.0028	2.00	67596	5830405N20Rik	RIKEN cDNA 5830405N20 gene (5830405N20Rik), mRNA
0.0098	2.01	69944	2810021J22Rik	RIKEN cDNA 2810021J22 gene (2810021J22Rik), mRNA
0.0265	2.01	623169	Gm6402	predicted pseudogene 6402 (Gm6402), non-coding RNA
0.0313	2.01	21923	Tnc	tenascin C (Tnc), mRNA
0.0148	2.02	17387	Mmp14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (Mmp14), mRNA
0.0153	2.02	68283	9530077C05Rik	RIKEN cDNA 9530077C05 gene (9530077C05Rik), mRNA
0.0479	2.02	20377	Sfrp1	secreted frizzled-related protein 1 (Sfrp1), mRNA
0.0147	2.02	212943	Fam46a	family with sequence similarity 46, member A (Fam46a), transcript variant 1, mRNA
0.0061	2.02	353211	Prune2	prune homolog 2 (Drosophila) (Prune2), mRNA
0.0011	2.02	320237	Ncrna00086	non-protein coding RNA 86 (Ncrna00086), non-coding RNA
0.0470	2.02	14226	Fkbp1b	FK506 binding protein 1b (Fkbp1b), mRNA
0.0481	2.02	223272	Itgbl1	integrin, beta-like 1 (Itgbl1), mRNA
0.0260	2.03	19204	Ptafr	platelet-activating factor receptor (Ptafr), mRNA
0.0006	2.03	18125	Nos1	nitric oxide synthase 1, neuronal (Nos1), mRNA
0.0102	2.03	22240	Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3 (Dpysl3), transcript variant 2, mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0001	2.03	234353	Psd3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3 (Psd3), transcript variant 2, mRNA
0.0048	2.03	17534	Mrc2	mannose receptor, C type 2 (Mrc2), mRNA
0.0039	2.03	12228	Btg3	B-cell translocation gene 3 (Btg3), mRNA
0.0018	2.04	54137	Acrbp	proacrosin binding protein (Acrbp), transcript variant 1, mRNA
0.0234	2.04	269855	A430110N23Rik	RIKEN cDNA A430110N23 gene (A430110N23Rik), mRNA
0.0035	2.04	380698	Obscn	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF (Obscn), transcript variant 2, mRNA
0.0090	2.04	666938	Bend4	BEN domain containing 4 (Bend4), mRNA
0.0166	2.04	22160	Twist1	twist homolog 1 (Drosophila) (Twist1), mRNA
0.0138	2.05	12831	Col5a1	collagen, type V, alpha 1 (Col5a1), mRNA
0.0358	2.05	259148	Olfr329-ps	olfactory receptor 329, pseudogene (Olfr329-ps), mRNA
0.0010	2.05	13417	Dnahc8	dynein, axonemal, heavy chain 8 (Dnahc8), mRNA
0.0260	2.05	14281	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene (Fos), mRNA
0.0143	2.05	331004	Slc9a9	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9 (Slc9a9), mRNA
0.0012	2.06	100043309	4732414G09Rik	PREDICTED: hypothetical protein LOC100048836 (LOC100048836), mRNA
0.0140	2.06	613264	1810020O05Rik	PREDICTED: Riken cDNA 1810020O05 gene (1810020O05Rik), mRNA
0.0021	2.06	620695	Gm13889	predicted gene 13889 (Gm13889), mRNA
0.0008	2.06	105785	Kdelr3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3 (Kdelr3), mRNA
0.0021	2.07	77577	Spns3	spinster homolog 3 (Drosophila) (Spns3), mRNA
0.0025	2.07	67246	2810474O19Rik	RIKEN cDNA 2810474O19 gene (2810474O19Rik), mRNA
0.0260	2.07	12837	Col8a1	collagen, type VIII, alpha 1 (Col8a1), mRNA
0.0000	2.07	18795	Plcb1	phospholipase C, beta 1 (Plcb1), transcript variant 2, mRNA
0.0011	2.07	99296	Hrh3	histamine receptor H3 (Hrh3), mRNA
0.0105	2.07	319520	Dusp4	dual specificity phosphatase 4 (Dusp4), mRNA
0.0000	2.07	320924	Ccbe1	collagen and calcium binding EGF domains 1 (Ccbe1), mRNA
0.0001	2.07	73075	Ppil6	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 6 (Ppil6), mRNA
0.0044	2.07	20728	Spic	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related) (Spic), mRNA
0.0058	2.08	16918	Mycl1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian) (Mycl1), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0215	2.08	211323	Nrg1	neuregulin 1 (Nrg1), mRNA
0.0136	2.08	27493	A230006K03Rik	PolyQ-containing protein CAG-8 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q0Z9Z6]
0.0077	2.08	68655	Fndc1	fibronectin type III domain containing 1 (Fndc1), mRNA
0.0137	2.09	240058	Cpne5	copine V (Cpne5), mRNA
0.0129	2.09	100046730	LOC100046730	PREDICTED: similar to integrin alpha 9 protein (LOC100046730), mRNA
0.0064	2.09	20379	Sfrp4	secreted frizzled-related protein 4 (Sfrp4), mRNA
0.0485	2.09	12818	Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1 (Col14a1), mRNA
0.0027	2.09	545047	Gm5800	predicted gene 5800 (Gm5800), mRNA
0.0040	2.09	23965	Odz3	odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila) (Odz3), transcript variant 2, mRNA
0.0013	2.09	74646	Spsb1	spla/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:1921896]
0.0321	2.09	226419	Dyrk3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3 (Dyrk3), mRNA
0.0456	2.09	64095	Gpr35	G protein-coupled receptor 35 (Gpr35), transcript variant 1, mRNA
0.0003	2.10	94214	Spock2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2 (Spock2), mRNA
0.0326	2.10	16764	Aff3	AF4/FMR2 family, member 3 (Aff3), mRNA
0.0233	2.10	21827	Thbs3	thrombospondin 3 (Thbs3), mRNA
0.0221	2.10	14314	Fstl1	folliculin-like 1 (Fstl1), mRNA
0.0329	2.10	20682	Sox9	SRY-box containing gene 9 (Sox9), mRNA
0.0427	2.10	242050	Igsf10	immunoglobulin superfamily, member 10 (Igsf10), mRNA
0.0024	2.10	22017	Tpmt	thiopurine methyltransferase (Tpmt), mRNA
0.0083	2.11	100042750	Gm4008	PREDICTED: similar to ERV-BabFcenv provirus ancestral Env polyprotein precursor (Envelope polyprotein) (BabFcenv) (LOC100045561), mRNA
0.0172	2.11	328314	Gm5086	PREDICTED: predicted gene, EG328314 (EG328314), mRNA
0.0000	2.11	640683	LOC640683	PREDICTED: similar to heat shock protein family, member 7 (cardiovascular) (LOC640683), mRNA
0.0064	2.12	57740	Stk32c	serine/threonine kinase 32C (Stk32c), transcript variant 1, mRNA
0.0007	2.12	20564	Slit3	slit homolog 3 (Drosophila) (Slit3), mRNA
0.0016	2.12	56421	Pfkip	phosphofructokinase, platelet (Pfkip), mRNA
0.0041	2.12	118449	Synpo2	synaptopodin 2 (Synpo2), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0277	2.12	320664	Cass4	Cas scaffolding protein family member 4 (Cass4), transcript variant 1, mRNA
0.0092	2.13	84112	Sucnr1	succinate receptor 1 (Sucnr1), mRNA
0.0088	2.13	77647	Trat1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1 (Trat1), mRNA
0.0122	2.13	11501	Adam8	a disintegrin and metallopeptidase domain 8 (Adam8), mRNA
0.0311	2.13	320664	Cass4	Cas scaffolding protein family member 4 (Cass4), transcript variant 2, mRNA
0.0157	2.13	210035	Tmem194	transmembrane protein 194 (Tmem194), transcript variant 2, mRNA
0.0002	2.14	330222	Sdk1	sidekick homolog 1 (chicken) (Sdk1), mRNA
0.0035	2.14	52139	D5Erttd560e	0 day neonate kidney cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D630034B18 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0029	2.14	240776	Kcnt2	potassium channel, subfamily T, member 2 (Kcnt2), mRNA
0.0060	2.14	242109	Zfp697	zinc finger protein 697 (Zfp697), mRNA
0.0000	2.14	252837	Ccr11	chemokine (C-C motif) receptor-like 1 (Ccr11), mRNA
0.0093	2.14	11658	Alcam	activated leukocyte cell adhesion molecule (Alcam), mRNA
0.0009	2.14	234365	Yjefn3	YjeF N-terminal domain containing 3 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:2681845]
0.0142	2.14	13852	Stx2	syntaxin 2 (Stx2), mRNA
0.0083	2.14	78177	Ninl	ninein-like (Ninl), mRNA
0.0077	2.14	11604	Agrp	agouti related protein (Agrp), mRNA
0.0312	2.15	320712	Abi3bp	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein (Abi3bp), transcript variant 5, mRNA
0.0177	2.15	381218	4430402I18Rik	RIKEN cDNA 4430402I18 gene (4430402I18Rik), mRNA
0.0002	2.15	12609	Cebpd	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta (Cebpd), mRNA
0.0003	2.15	320472	Ppm1e	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing) (Ppm1e), mRNA
0.0114	2.16	16854	Lgals3	lectin, galactose binding, soluble 3 (Lgals3), transcript variant 1, mRNA
0.0045	2.16	329941	Col8a2	collagen, type VIII, alpha 2 (Col8a2), mRNA
0.0006	2.16	18552	Pcsk5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 (Pcsk5), transcript variant 2, mRNA
0.0101	2.16	12484	Cd24a	CD24a antigen (Cd24a), mRNA
0.0026	2.16	217682	3830431G21Rik	RIKEN cDNA 3830431G21 gene (3830431G21Rik), mRNA
0.0390	2.16	432561	Gm9837	PREDICTED: predicted gene, ENSMUSG00000049427 (ENSMUSG00000049427), misc RNA
0.0010	2.16	381835	Gm1078	Putative uncharacterized serine/threonine-protein kinase SgK110 (EC 2.7.11.1)(Sugen kinase 110) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:POC5K0]

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0068	2.17	14429	Galr3	galanin receptor 3 (Galr3), mRNA
0.0327	2.17	231633	Tmem119	transmembrane protein 119 (Tmem119), mRNA
0.0002	2.17	12836	Col7a1	collagen, type VII, alpha 1 (Col7a1), mRNA
0.0007	2.17	66329	Susd3	sushi domain containing 3 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:1913579]
0.0370	2.17	69810	Clec4b1	C-type lectin domain family 4, member b1 (Clec4b1), transcript variant 1, mRNA
0.0252	2.17	676319	LOC676319	PREDICTED: hypothetical LOC676319 (LOC676319), mRNA
0.0059	2.17	100046030	LOC100046030	PREDICTED: similar to TRA13D-4 (LOC100046030), mRNA
0.0168	2.17	100042922	Gm14483	predicted gene 14483 (Gm14483), mRNA
0.0010	2.17	236285	Lancl3	LanC lantibiotic synthetase component C-like 3 (bacterial) (Lancl3), mRNA
0.0252	2.18	212943	Fam46a	family with sequence similarity 46, member A (Fam46a), transcript variant 1, mRNA
0.0014	2.18	12776	Ccr8	chemokine (C-C motif) receptor 8 (Ccr8), mRNA
0.0187	2.18	27401	Skp2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45) (Skp2), transcript variant 2, mRNA
0.0339	2.18	208439	Klhl29	kelch-like 29 (Drosophila) (Klhl29), mRNA
0.0015	2.18	234353	Psd3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3 (Psd3), transcript variant 1, mRNA
0.0003	2.19	14654	Gla1	glycine receptor, alpha 1 subunit (Gla1), mRNA
0.0088	2.19	234797	6430548M08Rik	RIKEN cDNA 6430548M08 gene (6430548M08Rik), transcript variant 1, mRNA
0.0001	2.19	58238	Fam181b	family with sequence similarity 181, member B (Fam181b), mRNA
0.0034	2.19	100169880	5830419E12Rik	adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5830419E12 product:hypothetical protein, full insert sequence.
0.0041	2.20	16985	Lsp1	lymphocyte specific 1 (Lsp1), transcript variant 2, mRNA
0.0231	2.20	105976	AU022793	NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F630305H02 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0000	2.20	18081	Ninj1	ninjurin 1 (Ninj1), mRNA
0.0054	2.20	252837	Ccr1	chemokine receptor CCX CKR mRNA, complete cds, alternatively spliced.
0.0022	2.20	50530	Mfap5	microfibrillar associated protein 5 (Mfap5), mRNA
0.0000	2.20	68859	1190007F08Rik	RIKEN cDNA 1190007F08 gene (1190007F08Rik), transcript variant 1, mRNA
0.0365	2.20	330096	Shisa3	shisa homolog 3 (Xenopus laevis) (Shisa3), mRNA
0.0008	2.20	100042419	Gm13956	PREDICTED: similar to T cell receptor alpha (LOC100043969), mRNA
0.0002	2.21	244757	Glb1l2	galactosidase, beta 1-like 2 (Glb1l2), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0188	2.21	320095	6430550D23Rik	RIKEN cDNA 6430550D23 gene (6430550D23Rik), transcript variant 1, mRNA
0.0122	2.22	14825	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (Cxcl1), mRNA
0.0000	2.22	171286	Slc12a8	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 8 (Slc12a8), transcript variant 1, mRNA
0.0291	2.22	433485	Tmem90b	transmembrane protein 90B (Tmem90b), mRNA
0.0010	2.22	26877	B3galt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1 (B3galt1), mRNA
0.0191	2.23	234967	Slc36a4	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4 (Slc36a4), mRNA
0.0386	2.23	56847	Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3 (Aldh1a3), mRNA
0.0361	2.23	16822	Lcp2	lymphocyte cytosolic protein 2 (Lcp2), mRNA
0.0227	2.23	107581	Col16a1	collagen, type XVI, alpha 1 (Col16a1), mRNA
0.0095	2.24	78733	Troap	trophinin associated protein (Troap), transcript variant 1, mRNA
0.0184	2.24	12628	Cfh	complement component factor h (Cfh), mRNA
0.0191	2.24	67896	Ccdc80	coiled-coil domain containing 80 (Ccdc80), mRNA
0.0112	2.24	58861	Cysltr1	cysteinyl leukotriene receptor 1 (Cysltr1), mRNA
0.0011	2.24	13982	Esr1	estrogen receptor 1 (alpha) (Esr1), mRNA
0.0202	2.24	100043862	Gm4697	PREDICTED: similar to polyprotein (LOC100043862), mRNA
0.0183	2.25	100043020	Gm11680	PREDICTED: hypothetical protein LOC100046870 (LOC100046870), mRNA
0.0266	2.25	239845	Gpr156	G protein-coupled receptor 156 (Gpr156), mRNA
0.0003	2.26	18824	Plp2	proteolipid protein 2 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:1298382]
0.0093	2.26	243277	Gpr133	G protein-coupled receptor 133 (Gpr133), mRNA
0.0412	2.26	21897	Tlr1	toll-like receptor 1 (Tlr1), mRNA
0.0232	2.26	73668	Ttc21b	tetratricopeptide repeat domain 21B (Ttc21b), mRNA
0.0007	2.26	21812	Tgfb1	transforming growth factor, beta receptor I (Tgfb1), mRNA
0.0000	2.26	320129	Adrbk2	adrenergic receptor kinase, beta 2 (Adrbk2), transcript variant 2, mRNA
0.0070	2.26	66815	Ccdc109b	coiled-coil domain containing 109B (Ccdc109b), mRNA
0.0195	2.26	216725	Adamts2	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2 (Adamts2), mRNA
0.0081	2.27	71740	Pvrl4	poliovirus receptor-related 4 (Pvrl4), transcript variant 1, mRNA
0.0234	2.27	12519	Cd80	CD80 antigen (Cd80), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0005	2.27	18762	Prkcz	protein kinase C, zeta (Prkcz), transcript variant 1, mRNA
0.0010	2.27	13841	Epha7	Eph receptor A7 (Epha7), transcript variant 2, mRNA
0.0004	2.28	259302	Srgap3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 (Srgap3), mRNA
0.0045	2.28	69149	Kbtbd3	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3 (Kbtbd3), transcript variant 1, mRNA
0.0294	2.29	258168	Olfr566	olfactory receptor 566 (Olfr566), mRNA
0.0038	2.29	243274	Tmem132d	transmembrane protein 132D (Tmem132d), mRNA
0.0193	2.29	64450	Gpr85	G protein-coupled receptor 85 (Gpr85), mRNA
0.0049	2.29	19217	Ptger2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2) (Ptger2), mRNA
0.0018	2.29	22329	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1 (Vcam1), mRNA
0.0019	2.29	641089	LOC641089	PREDICTED: hypothetical LOC641089 (LOC641089), mRNA
0.0166	2.29	27386	Npas3	neuronal PAS domain protein 3 (Npas3), mRNA
0.0115	2.30	73893	Tmem202	transmembrane protein 202 (Tmem202), mRNA
0.0108	2.30	21827	Thbs3	thrombospondin 3 (Thbs3), mRNA
0.0019	2.30	54667	Atp8b2	ATPase, class I, type 8B, member 2 (Atp8b2), mRNA
0.0384	2.30	12843	Col1a2	collagen, type I, alpha 2 (Col1a2), mRNA
0.0010	2.30	230735	Epha10	Eph receptor A10 (Epha10), mRNA
0.0067	2.31	319178	Hist1h2bb	histone cluster 1, H2bb (Hist1h2bb), mRNA
0.0215	2.32	320095	6430550D23Rik	RIKEN cDNA 6430550D23 gene (6430550D23Rik), transcript variant 1, mRNA
0.0018	2.32	20563	Slit2	slit homolog 2 (Drosophila) (Slit2), mRNA
0.0132	2.33	21983	Tpbpg	trophoblast glycoprotein (Tpbpg), transcript variant 1, mRNA
0.0469	2.33	244233	Cd163l1	CD163 molecule-like 1 (Cd163l1), mRNA
0.0390	2.33	102242	AU024180	16 days neonate heart cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D830036N23 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0183	2.33	51795	Srpx	sushi-repeat-containing protein (Srpx), mRNA
0.0015	2.33	338362	Ust	uronyl-2-sulfotransferase (Ust), mRNA
0.0000	2.33	320924	Ccbe1	collagen and calcium binding EGF domains 1 (Ccbe1), mRNA
0.0021	2.34	57246	Tbx20	T-box 20 (Tbx20), transcript variant 2, mRNA
0.0042	2.34	18787	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1 (Serpine1), mRNA
0.0110	2.34	54722	Dfna5	deafness, autosomal dominant 5 (human) (Dfna5), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0001	2.34	109323	C1qtnf7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:1925911]
0.0052	2.35	27047	Omd	osteomodulin (Omd), mRNA
0.0005	2.35	20272	Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha (Scn7a), mRNA
0.0377	2.35	100044074	LOC100044074	PREDICTED: similar to cyclic nucleotide gated channel beta 1 (LOC100044074), mRNA
0.0326	2.35	12534	Cdk1	cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1), mRNA
0.0000	2.35	12575	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a), transcript variant 1, mRNA
0.0298	2.36	74476	4933439C10Rik	9 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D030071E17 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0098	2.36	320189	9430076C15Rik	RIKEN cDNA 9430076C15 gene (9430076C15Rik), non-coding RNA
0.0018	2.36	11517	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1 (Adcyap1r1), transcript variant 1, mRNA
0.0021	2.37	22223	Uchl1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (Uchl1), mRNA
0.0050	2.37	12819	Col15a1	collagen, type XV, alpha 1 (Col15a1), mRNA
0.0181	2.37	99503	AA517023	BX527063 Knowles Solter mouse E6 5d whole embryo cDNA clone IMAGp998O122217 ; IMAGE:893795, mRNA sequence
0.0006	2.38	268395	Mpg	N-methylpurine-DNA glycosylase (Mpg), mRNA
0.0433	2.38	74687	4930443O20Rik	adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930443O20 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0032	2.39	19268	Ptprf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F (Ptprf), mRNA
0.0000	2.39	320655	Pgap3	post-GPI attachment to proteins 3 (Pgap3), mRNA
0.0018	2.39	330267	Thsd7a	thrombospondin, type I, domain containing 7A (Thsd7a), mRNA
0.0172	2.39	232801	Lilra5	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5 (Lilra5), mRNA
0.0385	2.40	319304	A730081D07Rik	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A730081D07 product:glucosaminyltransferase, I-branching enzyme, full insert sequence.
0.0001	2.40	73600	1700120C14Rik	BX512981 Soares mouse p3NMF19.5 cDNA clone IMAGp998M041174 ; IMAGE:493227, mRNA sequence
0.0124	2.40	15234	Hgf	hepatocyte growth factor (Hgf), mRNA
0.0014	2.40	330267	Thsd7a	thrombospondin, type I, domain containing 7A (Thsd7a), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0291	2.41	16176	Il1b	interleukin 1 beta (Il1b), mRNA
0.0270	2.42	242050	Igsf10	immunoglobulin superfamily, member 10 (Igsf10), mRNA
0.0000	2.42	94190	Ophn1	oligophrenin 1 (Ophn1), mRNA
0.0002	2.43	75458	Cklf	chemokine-like factor (Cklf), transcript variant 4, mRNA
0.0007	2.43	330230	Zfp853	PREDICTED: gene model 792, (NCBI) (Gm792), mRNA
0.0042	2.43	21930	Tnfaip6	tumor necrosis factor alpha induced protein 6 (Tnfaip6), mRNA
0.0099	2.44	20295	Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17 (Ccl17), mRNA
0.0031	2.44	100342	Fam46b	family with sequence similarity 46, member B (Fam46b), mRNA
0.0033	2.44	69987	1700026L06Rik	RIKEN cDNA 1700026L06 gene (1700026L06Rik), mRNA
0.0119	2.44	245945	Rbm47	RNA binding motif protein 47 (Rbm47), transcript variant 1, mRNA
0.0006	2.45	22756	Zfp94	zinc finger protein 94 (Zfp94), mRNA
0.0041	2.45	18729	Pira6	paired-Ig-like receptor A6 (Pira6), transcript variant 2, mRNA
0.0255	2.45	226025	Trpm3	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3 (Trpm3), transcript variant 7, mRNA
0.0177	2.46	74116	Pi16	peptidase inhibitor 16 (Pi16), mRNA
0.0356	2.46	320832	Sirpb1a	signal-regulatory protein beta 1A (Sirpb1a), transcript variant 3, mRNA
0.0001	2.47	108897	Aif1l	allograft inflammatory factor 1-like (Aif1l), mRNA
0.0150	2.47	12819	Col15a1	collagen, type XV, alpha 1 (Col15a1), mRNA
0.0035	2.48	245446	Slitrk4	SLIT and NTRK-like family, member 4 (Slitrk4), mRNA
0.0000	2.48	69156	Comtd1	catechol-O-methyltransferase domain containing 1 (Comtd1), mRNA
0.0040	2.48	67687	1700011L22Rik	RIKEN cDNA 1700011L22 gene (1700011L22Rik), mRNA
0.0029	2.48	243923	Rgs9bp	regulator of G-protein signalling 9 binding protein (Rgs9bp), mRNA
0.0016	2.49	69982	Spink2	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (Spink2), mRNA
0.0259	2.49	67573	Loxl4	lysyl oxidase-like 4 (Loxl4), transcript variant 1, mRNA
0.0378	2.49	100038947	LOC100038947	signal-regulatory protein beta 1-like (LOC100038947), mRNA
0.0311	2.49	22403	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2 (Wisp2), mRNA
0.0007	2.50	71409	Fmn12	formin-like 2 (Fmn12), mRNA
0.0015	2.51	22017	Tpmt	thiopurine methyltransferase (Tpmt), mRNA
0.0144	2.52	100039019	Mup-ps12	PREDICTED: similar to Predicted gene, OTTMUSG00000007485 (LOC100039019), misc RNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0286	2.53	330267	Thsd7a	thrombospondin, type I, domain containing 7A (Thsd7a), mRNA
0.0390	2.53	545637	Gm11758	predicted gene 11758 (Gm11758), mRNA
0.0052	2.53	18048	Klk1b4	kallikrein 1-related peptidase b4 (Klk1b4), mRNA
0.0008	2.53	434729	Gm5635	predicted gene 5635 (Gm5635), mRNA
0.0030	2.53	73647	Capn9	calpain 9 (Capn9), mRNA
0.0022	2.53	208104	MLxip	MLX interacting protein (MLxip), transcript variant 1, mRNA
0.0029	2.54	15478	Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1 (Hs3st3a1), mRNA
0.0000	2.56	19220	Ptgfr	prostaglandin F receptor (Ptgfr), mRNA
0.0008	2.57	245446	Slitrk4	SLIT and NTRK-like family, member 4 (Slitrk4), mRNA
0.0159	2.57	12832	Col5a2	collagen, type V, alpha 2 (Col5a2), mRNA
0.0000	2.58	665070	Gm7475	PREDICTED: predicted gene, EG665070 (EG665070), mRNA
0.0112	2.58	381002	Gm5144	PREDICTED: hypothetical LOC381002 (LOC381002), misc RNA
0.0002	2.59	14681	Gnao1	guanine nucleotide binding protein, alpha O (Gnao1), transcript variant A, mRNA
0.0003	2.59	66371	Chmp4c	chromatin modifying protein 4C (Chmp4c), mRNA
0.0002	2.59	268395	Mpg	N-methylpurine-DNA glycosylase (Mpg), mRNA
0.0256	2.59	399633	A630014C17Rik	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630014C17 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0095	2.59	242620	Dmrta2	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A2 (Dmrta2), mRNA
0.0012	2.60	16499	Kcnab3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 3 (Kcnab3), mRNA
0.0460	2.61	14219	Ctgf	connective tissue growth factor (Ctgf), mRNA
0.0082	2.61	237891	Gas2l2	growth arrest-specific 2 like 2 (Gas2l2), mRNA
0.0012	2.61	78102	8430426J06Rik	16 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:8430426J06 product:hypothetical protein, full insert sequence.
0.0001	2.61	22793	Zyx	zyxin (Zyx), mRNA
0.0001	2.62	100048348	LOC100048348	PREDICTED: hypothetical protein LOC100048348 (LOC100048348), mRNA
0.0000	2.62	72097	2010300C02Rik	RIKEN cDNA 2010300C02 gene (2010300C02Rik), mRNA
0.0064	2.62	236900	Pdk3	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3 (Pdk3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0007	2.62	29858	Pmm1	phosphomannomutase 1 (Pmm1), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0115	2.63	14562	Gdf3	growth differentiation factor 3 (Gdf3), mRNA
0.0338	2.64	12842	Col1a1	collagen, type I, alpha 1 (Col1a1), mRNA
0.0022	2.64	244579	Tox3	TOX high mobility group box family member 3 (Tox3), mRNA
0.0021	2.64	15904	Id4	inhibitor of DNA binding 4 (Id4), mRNA
0.0431	2.64	100046475	LOC100046475	PREDICTED: similar to gag polyprotein (LOC100046475), mRNA
0.0065	2.65	78403	2900041M22Rik	RIKEN cDNA 2900041M22 gene (2900041M22Rik), non-coding RNA
0.0000	2.65	69539	Trnp1	TMF1-regulated nuclear protein 1 (Trnp1), mRNA
0.0347	2.65	12825	Col3a1	collagen, type III, alpha 1 (Col3a1), mRNA
0.0009	2.66	69602	Otop3	otopetrin 3 (Otop3), mRNA
0.0039	2.68	244579	Tox3	TOX high mobility group box family member 3 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3039593]
0.0009	2.68	30794	Pdlim4	PDZ and LIM domain 4 (Pdlim4), mRNA
0.0000	2.68	100044854	LOC100044854	PREDICTED: similar to chromatin modifying protein 4C (LOC100044854), mRNA
0.0357	2.68	19225	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2), mRNA
0.0081	2.69	15370	Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nr4a1), mRNA
0.0130	2.70	17882	Myh2	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult (Myh2), mRNA
0.0238	2.70	503845	Ear12	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 12 (Ear12), mRNA
0.0249	2.70	54483	Mefv	Mediterranean fever (Mefv), transcript variant 3, mRNA
0.0034	2.70	100043272	5430417L22Rik	RIKEN cDNA 5430417L22 gene (5430417L22Rik), non-coding RNA
0.0249	2.71	68797	Pdgfrl	platelet-derived growth factor receptor-like (Pdgfrl), mRNA
0.0018	2.74	195209	Gm22	predicted gene 22 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2684868]
0.0001	2.74	233529	Kctd14	potassium channel tetramerisation domain containing 14 (Kctd14), transcript variant 2, mRNA
0.0078	2.76	21825	Thbs1	thrombospondin 1 (Thbs1), mRNA
0.0000	2.76	258961	Olfr631	olfactory receptor 631 (Olfr631), mRNA
0.0018	2.77	58801	Pmaip1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Pmaip1), mRNA
0.0186	2.78	114142	Foxp2	forkhead box P2 (Foxp2), transcript variant 1, mRNA
0.0130	2.79	18725	Pira2	paired-Ig-like receptor A2 (Pira2), mRNA
0.0297	2.80	93695	Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb), mRNA
0.0155	2.80	319909	Ism1	isthmin 1 homolog (zebrafish) (Ism1), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0005	2.80	243842	Gltscr1	glioma tumor suppressor candidate region gene 1 (Gltscr1), mRNA
0.0001	2.80	72902	Spock3	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 3 (Spock3), mRNA
0.0044	2.81	103288	Al836737	BB456416 RIKEN full-length enriched, 12 days embryo spinal ganglion cDNA clone D130046J21 3'.
0.0007	2.82	100044727	LOC100044727	PREDICTED: hypothetical protein LOC100044727 (LOC100044727), mRNA
0.0285	2.82	66949	Trim59	tripartite motif-containing 59 (Trim59), mRNA
0.0039	2.83	20278	Scnn1g	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma (Scnn1g), mRNA
0.0131	2.83	18213	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3), transcript variant 2, mRNA
0.0345	2.83	53623	Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3) (Gria3), mRNA
0.0296	2.84	20204	Prrx2	paired related homeobox 2 (Prrx2), mRNA
0.0016	2.84	94226	S1pr5	sphingosine-1-phosphate receptor 5 (S1pr5), mRNA
0.0000	2.85	231646	Myo1h	myosin 1H (Myo1h), mRNA
0.0001	2.85	12891	Cpne6	copine VI (Cpne6), transcript variant 2, mRNA
0.0408	2.86	69700	Col22a1	collagen, type XXII, alpha 1 (Col22a1), mRNA
0.0080	2.86	13723	Emb	embigin (Emb), mRNA
0.0001	2.86	13841	Epha7	Eph receptor A7 (Epha7), transcript variant 1, mRNA
0.0003	2.86	99738	Kcnc4	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 4 (Kcnc4), mRNA
0.0007	2.88	240879	Mettl11b	methyltransferase like 11B (Mettl11b), mRNA
0.0000	2.88	12587	Mia1	melanoma inhibitory activity 1 (Mia1), mRNA
0.0006	2.90	19735	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2), mRNA
0.0117	2.91	56642	Ankrd2	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle) (Ankrd2), mRNA
0.0001	2.92	268527	Greb1	gene regulated by estrogen in breast cancer protein (Greb1), mRNA
0.0476	2.93	665033	Gm7455	predicted gene 7455 (Gm7455), mRNA
0.0039	2.93	20215	Sag	retinal S-antigen (Sag), mRNA
0.0367	2.93	17474	Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d (Clec4d), transcript variant 1, mRNA
0.0034	2.95	106861	Abhd3	abhydrolase domain containing 3 (Abhd3), mRNA
0.0001	2.95	212980	Slc45a3	solute carrier family 45, member 3 (Slc45a3), mRNA
0.0056	2.96	18211	Ntrk1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 (Ntrk1), mRNA
0.0014	2.96	18991	Pou3f1	POU domain, class 3, transcription factor 1 (Pou3f1), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0026	2.96	332175	Zdhhc23	zinc finger, DHHC domain containing 23 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2685625]
0.0240	2.97	66959	Dusp26	dual specificity phosphatase 26 (putative) (Dusp26), mRNA
0.0173	2.98	14709	Gng8	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8 (Gng8), mRNA
0.0016	2.99	73844	Ankrd45	ankyrin repeat domain 45 (Ankrd45), mRNA
0.0331	2.99	50781	Dkk3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Dkk3), mRNA
0.0020	3.00	19735	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2), mRNA
0.0065	3.00	100040598	Gm2861	PREDICTED: hypothetical protein LOC100040598 (LOC100040598), mRNA
0.0195	3.01	50490	Nox4	NADPH oxidase 4 (Nox4), mRNA
0.0166	3.01	232414	Clec9a	C-type lectin domain family 9, member a (Clec9a), mRNA
0.0009	3.01	237625	Pla2g3	phospholipase A2, group III (Pla2g3), mRNA
0.0002	3.01	56857	Slc37a2	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2 (Slc37a2), transcript variant 1, mRNA
0.0011	3.06	665282	Gm7568	PREDICTED: predicted gene, EG665282 (EG665282), mRNA
0.0147	3.06	69416	1700025F22Rik	RIKEN cDNA 1700025F22 gene (1700025F22Rik), mRNA
0.0122	3.06	638904	Gm7254	PREDICTED: predicted gene, EG638904 (EG638904), mRNA
0.0287	3.07	319317	Snhg11	small nucleolar RNA host gene 11 (non-protein coding) (Snhg11), mRNA
0.0001	3.09	21987	Tpd52l1	tumor protein D52-like 1 (Tpd52l1), mRNA
0.0012	3.09	69784	1500009L16Rik	RIKEN cDNA 1500009L16 gene (1500009L16Rik), mRNA
0.0019	3.09	100043792	Gm14066	PREDICTED: hypothetical protein LOC100043792 (LOC100043792), mRNA
0.0018	3.11	69137	2200002K05Rik	RIKEN cDNA 2200002K05 gene (2200002K05Rik), mRNA
0.0332	3.13	13874	Ereg	epiregulin (Ereg), mRNA
0.0015	3.15	21955	Tnnt1	troponin T1, skeletal, slow (Tnnt1), mRNA
0.0132	3.15	21414	Tcf7	transcription factor 7, T-cell specific (Tcf7), mRNA
0.0029	3.16	100043131	Gm4250	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230214C06 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0020	3.16	76117	Arhgap15	Rho GTPase activating protein 15 (Arhgap15), transcript variant 2, mRNA
0.0138	3.17	67606	Fibin	fin bud initiation factor homolog (zebrafish) (Fibin), mRNA
0.0000	3.18	219134	Shisa2	shisa homolog 2 (Xenopus laevis) (Shisa2), mRNA
0.0005	3.18	76905	Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (Lrg1), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0437	3.20	50706	Postn	periostin, osteoblast specific factor (Postn), mRNA
0.0000	3.20	20887	Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1 (Sult1a1), mRNA
0.0054	3.20	56857	Slc37a2	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2 (Slc37a2), transcript variant 2, mRNA
0.0150	3.21	17700	Mstn	myostatin (Mstn), mRNA
0.0106	3.22	674761	LOC674761	PREDICTED: similar to beta myosin heavy chain (LOC674761), mRNA
0.0033	3.23	20471	Six1	sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila) (Six1), mRNA
0.0108	3.23	665054	D330025C20Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA D330025C20 gene (D330025C20Rik), mRNA
0.0004	3.27	217371	Rab40b	Rab40b, member RAS oncogene family (Rab40b), mRNA
0.0080	3.28	13603	Opn3	opsin 3 (Opn3), mRNA
0.0000	3.29	12994	Csn3	casein kappa Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:107461]
0.0175	3.30	235416	Lman1l	lectin, mannose-binding 1 like (Lman1l), mRNA
0.0001	3.30	75458	Cklf	chemokine-like factor (Cklf), transcript variant 1, mRNA
0.0015	3.34	14313	Fst	follicle-stimulating hormone (Fst), mRNA
0.0234	3.34	319317	Snhg11	small nucleolar RNA host gene 11 (non-protein coding) (Snhg11), mRNA
0.0158	3.35	69553	Fam65c	family with sequence similarity 65, member C (Fam65c), mRNA
0.0098	3.36	242506	Frmd3	FERM domain containing 3 (Frmd3), transcript variant 1, mRNA
0.0171	3.36	242316	Gdf6	growth differentiation factor 6 (Gdf6), mRNA
0.0000	3.38	20887	Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1 (Sult1a1), mRNA
0.0000	3.39	667124	Gm8470	PREDICTED: predicted gene, EG667124 (EG667124), mRNA
0.0077	3.42	114640	Pth2	parathyroid hormone 2 (Pth2), mRNA
0.0046	3.44	20716	Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N (Serpina3n), mRNA
0.0008	3.44	53318	Pdlim3	PDZ and LIM domain 3 (Pdlim3), mRNA
0.0000	3.45	17967	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1 (Ncam1), transcript variant 2, mRNA
0.0000	3.46	75458	Cklf	chemokine-like factor (Cklf), transcript variant 1, mRNA
0.0000	3.49	73381	Cmtm2a	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2A (Cmtm2a), mRNA
0.0001	3.50	80879	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (Slc16a3), mRNA
0.0000	3.50	16197	Il7r	interleukin 7 receptor (Il7r), mRNA
0.0096	3.50	15117	Has2	hyaluronan synthase 2 (Has2), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0041	3.50	18720	Pip5k1a	CRL-1722 L5178Y-R cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:I730030E20 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0051	3.51	13654	Egr2	early growth response 2 (Egr2), mRNA
0.0001	3.52	209966	Pgbd5	piggyBac transposable element derived 5 (Pgbd5), mRNA
0.0001	3.52	319893	A230057D06Rik	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C230048B01 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0008	3.53	100046276	LOC100046276	PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 4631426E05 gene (LOC100046276), mRNA
0.0024	3.56	22240	Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3 (Dpysl3), transcript variant 1, mRNA
0.0173	3.56	320557	Fam169a	family with sequence similarity 169, member A (Fam169a), transcript variant 1, mRNA
0.0000	3.56	213469	Lgi3	leucine-rich repeat LGI family, member 3 (Lgi3), mRNA
0.0037	3.57	16693	Krtap11-1	keratin associated protein 11-1 (Krtap11-1), mRNA
0.0176	3.59	76293	Mfap4	microfibrillar-associated protein 4 (Mfap4), mRNA
0.0001	3.62	19273	Ptpru	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U (Ptpru), transcript variant 2, mRNA
0.0000	3.63	52793	Fam3b	family with sequence similarity 3, member B (Fam3b), mRNA
0.0011	3.69	18164	Nptx1	neuronal pentraxin 1 (Nptx1), mRNA
0.0156	3.70	140781	Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta (Myh7), mRNA
0.0001	3.72	66329	Susd3	sushi domain containing 3 (Susd3), mRNA
0.0001	3.75	80879	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (Slc16a3), mRNA
0.0001	3.78	105827	Amigo2	adhesion molecule with Ig like domain 2 (Amigo2), transcript variant 1, mRNA
0.0001	3.80	16819	Lcn2	lipocalin 2 (Lcn2), mRNA
0.0049	3.80	16193	Il6	interleukin 6 (Il6), mRNA
0.0000	3.80	69539	Trnp1	TMF1-regulated nuclear protein 1 (Trnp1), mRNA
0.0020	3.87	58802	Kcnmb4	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4 (Kcnmb4), mRNA
0.0048	3.88	16182	Il18r1	interleukin 18 receptor 1 (Il18r1), transcript variant 1, mRNA
0.0001	3.89	16396	Itch	itchy, E3 ubiquitin protein ligase (Itch), mRNA
0.0000	3.94	20539	Slc7a5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 (Slc7a5), mRNA
0.0001	3.95	108802	Calr4	calreticulin 4 (Calr4), mRNA [NM_001033226]
0.0020	3.96	13491	Drd4	dopamine receptor D4 (Drd4), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0000	3.97	16530	Kcnk7	potassium channel, subfamily K, member 7 (Kcnk7), mRNA
0.0002	3.97	433882	Gm16223	predicted gene 16223 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3648966]
0.0194	4.03	12772	Ccr2	chemokine (C-C motif) receptor 2 (Ccr2), mRNA
0.0047	4.07	403183	4832428D23Rik	RIKEN cDNA 4832428D23 gene (4832428D23Rik), mRNA
0.0042	4.09	27356	Insl6	insulin-like 6 (Insl6), mRNA
0.0001	4.12	15446	Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD) (Hpgd), mRNA
0.0198	4.14	320832	Sirpb1a	signal-regulatory protein beta 1A (Sirpb1a), transcript variant 3, mRNA
0.0000	4.17	21350	Tal2	T-cell acute lymphocytic leukemia 2 (Tal2), mRNA
0.0000	4.17	240444	Kcng2	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2 (Kcng2), mRNA
0.0006	4.23	71768	Vwce	von Willebrand factor C and EGF domains (Vwce), mRNA
0.0001	4.27	353188	Adam32	a disintegrin and metalloproteinase domain 32 (Adam32), mRNA
0.0054	4.31	20311	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (Cxcl5), mRNA
0.0067	4.39	18213	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3), transcript variant 1, mRNA
0.0030	4.40	21857	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), transcript variant 1, mRNA
0.0000	4.41	72160	Tmem163	transmembrane protein 163 (Tmem163), mRNA
0.0229	4.42	668101	Sirpb1b	signal-regulatory protein beta 1B (Sirpb1b), mRNA
0.0153	4.44	109959	Amy2a5	amylase 2a5 (Amy2a5), mRNA
0.0000	4.51	56405	Dusp14	dual specificity phosphatase 14 (Dusp14), mRNA
0.0000	4.51	67824	Nmral1	NmrA-like family domain containing 1 (Nmral1), mRNA
0.0004	4.54	384732	Gm10081	predicted gene 10081 (Gm10081), mRNA
0.0002	4.55	621884	Gm6267	PREDICTED: similar to CG2839-PA (LOC621884), mRNA
0.0000	4.60	208151	Tmem132b	transmembrane protein 132B (Tmem132b), mRNA
0.0001	4.63	13088	Cyp2b10	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10 (Cyp2b10), transcript variant 2, mRNA
0.0097	4.67	16619	Klk1b27	kallikrein 1-related peptidase b27 (Klk1b27), mRNA
0.0002	4.73	235402	Lingo1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1 (Lingo1), mRNA
0.0005	4.73	15446	Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD) (Hpgd), mRNA
0.0341	4.77	20319	Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2 (Sfrp2), mRNA
0.0013	4.85	225997	Trpm6	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6 (Trpm6), mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0027	4.95	329977	Fhad1	forkhead-associated (FHA) phosphopeptide binding domain 1 (Fhad1), mRNA
0.0000	5.00	15360	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0000	5.06	67824	Nmral1	NmrA-like family domain containing 1 (Nmral1), mRNA
0.0003	5.15	245610	Nxf3	nuclear RNA export factor 3 (Nxf3), mRNA
0.0015	5.22	16948	Lox	lysyl oxidase (Lox), mRNA
0.0003	5.29	270157	Gm684	PREDICTED: gene model 684, (NCBI) (Gm684), mRNA
0.0002	5.29	432450	Nkain2	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 2 (Nkain2), transcript variant 2, mRNA
0.0002	5.41	16531	Kcnma1	8 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5730414M22 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0000	5.46	104582	Rprml	reprimo-like (Rprml), mRNA
0.0052	5.50	17750	Mt2	metallothionein 2 (Mt2), mRNA
0.0034	5.50	18213	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3), transcript variant 2, mRNA
0.0012	5.58	13094	Cyp2b9	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9 (Cyp2b9), mRNA
0.0256	5.62	329941	Col8a2	collagen, type VIII, alpha 2 (Col8a2), mRNA
0.0228	5.62	22144	Tuba3a	tubulin, alpha 3A (Tuba3a), mRNA
0.0032	5.66	74189	Phactr3	phosphatase and actin regulator 3 (Phactr3), transcript variant 1, mRNA
0.0004	5.70	19288	Ptx3	pentraxin related gene (Ptx3), mRNA
0.0001	5.70	320127	Dgki	diacylglycerol kinase, iota (Dgki), mRNA
0.0000	5.83	75526	Spinlw1	serine protease inhibitor-like, with Kunitz and WAP domains 1 (eppin) (Spinlw1), mRNA
0.0000	5.84	17967	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1 (Ncam1), transcript variant 2, mRNA
0.0005	5.88	242505	Rasef	RAS and EF hand domain containing (Rasef), mRNA
0.0029	6.08	228770	Rspo4	R-spondin family, member 4 (Rspo4), transcript variant 1, mRNA
0.0000	6.19	75668	Rasl10a	RAS-like, family 10, member A (Rasl10a), mRNA
0.0000	6.19	70004	1700028J19Rik	RIKEN cDNA 1700028J19 gene (1700028J19Rik), non-coding RNA
0.0114	6.29	69564	Itgb1bp3	integrin beta 1 binding protein 3 (Itgb1bp3), mRNA
0.0000	6.31	13447	Doc2b	double C2, beta (Doc2b), mRNA
0.0001	6.56	15360	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes

0.0000	6.57	93761	Smarca1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1 (Smarca1), mRNA
0.0003	6.81	16622	Klk1b5	kallikrein 1-related peptidase b5 (Klk1b5), mRNA
0.0000	6.82	93761	Smarca1	8 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5730494M04 product:SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1, full insert sequence.
0.0000	6.85	110784	Nr3c2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 (Nr3c2), mRNA
0.0024	6.98	22144	Tuba3a	tubulin, alpha 3A (Tuba3a), mRNA
0.0000	7.11	18407	Orm3	orosomucoid 3 (Orm3), mRNA
0.0000	7.13	114662	Prss29	protease, serine, 29 (Prss29), mRNA
0.0006	7.41	245902	Ccdc15	coiled-coil domain containing 15 (Ccdc15), mRNA
0.0007	7.50	74189	Phactr3	phosphatase and actin regulator 3 (Phactr3), transcript variant 1, mRNA
0.0000	8.00	99543	Olfml3	olfactomedin-like 3 (Olfml3), mRNA
0.0014	8.44	195236	Pom121l2	POM121 membrane glycoprotein-like 2 (rat) (Pom121l2), transcript variant 1, mRNA
0.0000	8.60	14229	Fkbp5	FK506 binding protein 5 (Fkbp5), mRNA
0.0000	8.97	18948	Pnmt	phenylethanolamine-N-methyltransferase (Pnmt), mRNA
0.0002	9.55	13616	Edn3	endothelin 3 (Edn3), mRNA
0.0002	9.88	22673	Zfp185	zinc finger protein 185 (Zfp185), transcript variant 1, mRNA
0.0005	10.20	677606	LOC677606	PREDICTED: similar to Kallikrein 1-related peptidase b16 precursor (Gamma-renin, submandibular gland) (mGK-16) (LOC677606), misc RNA
0.0001	10.31	13646	Klk1b22	kallikrein 1-related peptidase b22 (Klk1b22), mRNA
0.0000	10.89	59011	Myoz1	myozenin 1 (Myoz1), mRNA
0.0124	10.94	16618	Klk1b26	kallikrein 1-related peptidase b26 (Klk1b26), mRNA
0.0000	11.28	74281	Spatc1	spermatogenesis and centriole associated 1 (Spatc1), mRNA
0.0000	11.46	16948	Lox	lysyl oxidase (Lox), mRNA
0.0000	13.19	103655	Sec14l4	SEC14-like 4 (S. cerevisiae) (Sec14l4), mRNA
0.0001	13.44	13647	Egfbp2	epidermal growth factor binding protein type B (Egfbp2), mRNA
0.0000	13.44	171531	MIph	melanophilin (MIph), mRNA
0.0002	13.63	791275	Gm9885	ENSMUSG00000052629 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q91VZ9]

Supplemental table S2: Microarray predicted MR regulated genes (MR untreated vs Ctrl untreated)

Up-regulated genes				
0.0000	13.94	16618	Klk1b26	kallikrein 1-related petidase b26 (Klk1b26), mRNA
0.0000	14.29	21953	Tnni2	troponin I, skeletal, fast 2 (Tnni2), mRNA
0.0002	14.72	11997	Akr1b7	aldo-keto reductase family 1, member B7 (Akr1b7), mRNA
0.0000	14.97	21957	Tnnt3	troponin T3, skeletal, fast (Tnnt3), transcript variant 1, mRNA
0.0000	15.35	71263	Mro	maestro (Mro), mRNA
0.0000	17.01	18185	Nrl	neural retina leucine zipper gene (Nrl), transcript variant 2, mRNA
0.0000	17.42	381925	Ppapdc1a	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A (Ppapdc1a), mRNA
0.0001	18.20	17768	Mthfd2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase (Mthfd2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0000	19.57	109959	Amy2a5	amylase 2a5 (Amy2a5), mRNA
0.0005	21.64	18185	Nrl	neural retina leucine zipper gene (Nrl), transcript variant 2, mRNA
0.0005	21.72	21957	Tnnt3	troponin T3, skeletal, fast (Tnnt3), transcript variant 7, mRNA
0.0000	21.97	268527	Greb1	gene regulated by estrogen in breast cancer protein (Greb1), mRNA
0.0000	24.52	627214	Fam196a	family with sequence similarity 196, member A (Fam196a), mRNA
0.0000	24.71	71803	Slc25a18	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 18 (Slc25a18), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0000	28.97	668723	Amy2-ps1	PREDICTED: similar to pancreatic alpha-amylase (LOC668723), misc RNA
0.0000	29.73	11722	Amy1	amylase 1, salivary (Amy1), transcript variant 1, mRNA
0.0000	30.94	16525	Kcnk1	potassium channel, subfamily K, member 1 (Kcnk1), mRNA
0.0000	34.73	107221	Gpr120	G protein-coupled receptor 120 (Gpr120), mRNA
0.0000	38.70	12705	Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1 (Cited1), mRNA
0.0000	48.47	208151	Tmem132b	transmembrane protein 132B (Tmem132b), mRNA
0.0029	49.22	16615	Klk1b16	kallikrein 1-related peptidase b16 (Klk1b16), mRNA

Genes are classified according to the fold change. Some genes may appear more than one time. P: P-Value; FC: Fold change.

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

p	FC	EntrezGeneID	GeneSymbol	Description
Down-regulated genes				
0.0028	2.00	73747	1110034G24Rik	RIKEN cDNA 1110034G24 gene (1110034G24Rik), mRNA
0.0042	2.01	13170	Dbp	D site albumin promoter binding protein (Dbp), mRNA
0.0260	2.01	100039225	Gm10322	PREDICTED: hypothetical protein LOC100039225 (LOC100039225), mRNA
0.0088	2.02	210356	Nckap5	NCK-associated protein 5 (Nckap5), transcript variant 2, mRNA
0.0469	2.02	319506	7530428D23Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 7530428D23 gene (7530428D23Rik), mRNA
0.0345	2.03	13842	Epha8	Eph receptor A8 (Epha8), mRNA
0.0226	2.03	142687	Asb14	ankyrin repeat and SOCS box-containing 14 (Asb14), transcript variant 1, mRNA
0.0136	2.04	268859	A2bp1	ataxin 2 binding protein 1 (A2bp1), transcript variant 2, mRNA
0.0032	2.05	252973	Grhl2	grainyhead-like 2 (Drosophila) (Grhl2), mRNA
0.0314	2.06	16857	Lgals6	lectin, galactose binding, soluble 6 (Lgals6), mRNA
0.0032	2.06	17165	Mapkapk5	PREDICTED: similar to MK-5 type 2 (LOC100047833), mRNA
0.0022	2.07	242702	Myom3	myomesin family, member 3 (Myom3), mRNA
0.0109	2.08	270190	Ephb1	Eph receptor B1 (Ephb1), transcript variant 1, mRNA
0.0078	2.09	11833	Aqp8	aquaporin 8 (Aqp8), transcript variant 1, mRNA
0.0127	2.10	75355	4930553P18Rik	adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930553P18 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0040	2.10	212276	Zfp748	zinc finger protein 748 (Zfp748), transcript variant 1, mRNA
0.0266	2.10	72713	Angptl1	angiopoietin-like 1 (Angptl1), mRNA
0.0155	2.12	12922	Crhr2	corticotropin releasing hormone receptor 2 (Crhr2), mRNA
0.0069	2.12	99031	Osbp16	oxysterol binding protein-like 6 (Osbp16), mRNA
0.0166	2.12	100042314	Gm10639	predicted gene 10639 (Gm10639), mRNA
0.0141	2.13	434232	lqck	IQ motif containing K (lqck), mRNA
0.0038	2.14	56508	Rapgef4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 (Rapgef4), mRNA
0.0209	2.15	73287	1700040L02Rik	RIKEN cDNA 1700040L02 gene (1700040L02Rik), mRNA
0.0414	2.15	100048634	LOC100048634	PREDICTED: similar to Interferon activated gene 205 (LOC100048634), misc RNA
0.0190	2.17	18705	Pik3c2g	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide (Pik3c2g), transcript variant 1, mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Down-regulated genes

0.0181	2.21	73671	Sult6b1	sulfotransferase family, cytosolic, 6B, member 1 (Sult6b1), mRNA
0.0112	2.21	382051	Pdp2	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2 (Pdp2), mRNA
0.0233	2.22	74492	Kbtbd13	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 13 (Kbtbd13), mRNA
0.0049	2.22	99031	Osbp16	oxysterol binding protein-like 6 (Osbp16), mRNA
0.0113	2.23	319953	Ttl1	tubulin tyrosine ligase-like 1 (Ttl1), mRNA
0.0178	2.24	13643	Efnb3	ephrin B3 (Efnb3), mRNA
0.0095	2.24	246049	Slc36a2	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2 (Slc36a2), mRNA
0.0148	2.24	629091	LOC629091	activated spleen cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F830221E13 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0212	2.25	320658	D430040L24Rik	13 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D430040L24 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0137	2.25	14858	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2) (Gsta2), mRNA
0.0236	2.26	26897	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1 (Acot1), mRNA
0.0451	2.27	78687	0610025J13Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 0610025J13 gene (0610025J13Rik), mRNA
0.0024	2.29	70134	2210011C24Rik	RIKEN cDNA 2210011C24 gene Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1917384]
0.0048	2.29	319991	Kif6	kinesin family member 6 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1098238]
0.0036	2.30	52234	D7Ertd183e	C78535 Mouse 3.5-dpc blastocyst cDNA cDNA clone J0050H08 3'.
0.0037	2.30	100045357	LOC100045357	PREDICTED: similar to mannosidase beta A lysosomal-like (LOC100045357), mRNA
0.0061	2.31	16855	Lgals4	lectin, galactose binding, soluble 4 (Lgals4), mRNA
0.0043	2.31	100044631	LOC100044631	PREDICTED: hypothetical protein LOC100044631 (LOC100044631), mRNA
0.0029	2.33	69371	1700023A16Rik	RIKEN cDNA 1700023A16 gene (1700023A16Rik), mRNA
0.0003	2.34	229599	Gm129	predicted gene 129 (Gm129), mRNA
0.0025	2.35	50874	Tmod4	tropomodulin 4 (Tmod4), mRNA
0.0130	2.35	100040750	Gm2945	PREDICTED: hypothetical protein LOC100040750 (LOC100040750), mRNA
0.0142	2.36	217874	BC048943	cDNA sequence BC048943 (BC048943), mRNA
0.0073	2.36	16855	Lgals4	lectin, galactose binding, soluble 4 (Lgals4), mRNA
0.0101	2.36	246747	Adig	adipogenin (Adig), mRNA
0.0088	2.38	16855	Lgals4	lectin, galactose binding, soluble 4 (Lgals4), mRNA
0.0033	2.42	319991	Kif6	kinesin family member 6 (Kif6), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Down-regulated genes

0.0066	2.43	319991	Kif6	kinesin family member 6 (Kif6), mRNA
0.0203	2.46	20739	Spna1	spectrin alpha 1 (Spna1), mRNA
0.0098	2.47	12292	Cacna1s	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit (Cacna1s), transcript variant 2, mRNA
0.0018	2.48	60425	Doc2g	double C2, gamma (Doc2g), mRNA
0.0145	2.50	20190	Ryr1	ryanodine receptor 1, skeletal muscle (Ryr1), mRNA
0.0008	2.51	14813	Grin2c	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C (epsilon 3) (Grin2c), mRNA
0.0113	2.51	69489	2310007J06Rik	adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2310007J06 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0217	2.55	328399	A930018M24Rik	adult male diencephalon cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9330167E06 product:unclassifiable, full insert sequence.
0.0154	2.58	16420	Itgb6	integrin beta 6 (Itgb6), transcript variant 2, mRNA
0.0051	2.60	104158	Ces3	carboxylesterase 3 (Ces3), mRNA
0.0135	2.62	16716	Ky	kyphoscoliosis peptidase (Ky), mRNA
0.0278	2.63	619289	Rfx8	regulatory factor X 8 (Rfx8), mRNA
0.0110	2.65	76443	2310016D23Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2310016D23 gene (2310016D23Rik), mRNA
0.0047	2.68	74020	Cpne4	copine IV (Cpne4), mRNA
0.0140	2.69	12292	Cacna1s	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit (Cacna1s), transcript variant 2, mRNA
0.0362	2.71	68695	Hddc3	HD domain containing 3 (Hddc3), mRNA
0.0080	2.77	11833	Aqp8	aquaporin 8 (Aqp8), transcript variant 1, mRNA
0.0216	2.79	74528	8430406I07Rik	RIKEN cDNA 8430406I07 gene (8430406I07Rik), mRNA
0.0055	2.80	244417	Gm501	PREDICTED: gene model 501, (NCBI) (Gm501), mRNA
0.0140	2.85	69578	2310016G11Rik	RIKEN cDNA 2310016G11 gene Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1916828]
0.0063	2.85	13491	Drd4	dopamine receptor D4 (Drd4), mRNA
0.0079	2.88	11435	Chrna1	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle) (Chrna1), mRNA
0.0045	2.88	213402	Armc2	armadillo repeat containing 2 (Armc2), mRNA
0.0025	2.88	272428	Acsn5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5 (Acsn5), mRNA
0.0159	2.91	240899	Lrrc52	leucine rich repeat containing 52 (Lrrc52), mRNA
0.0260	2.92	69671	Tmem52	transmembrane protein 52 Gene [Source:MGI (curated);Acc:MGI:1916921]

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Down-regulated genes

0.0161	2.98	213402	Armc2	armadillo repeat containing 2 (Armc2), mRNA
0.0134	3.11	353287	Clec18a	C-type lectin domain family 18, member A (Clec18a), mRNA
0.0389	3.13	665033	Gm7455	predicted gene 7455 (Gm7455), mRNA
0.0120	3.16	170483	Grin3b	glutamate receptor, ionotropic, NMDA3B (Grin3b), mRNA
0.0179	3.21	73813	Fam83e	family with sequence similarity 83, member E (Fam83e), mRNA
0.0050	3.26	69565	2310015K22Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2310015K22 gene (2310015K22Rik), mRNA
0.0018	3.27	319942	A530016L24Rik	RIKEN cDNA A530016L24 gene (A530016L24Rik), mRNA
0.0012	3.45	666385	Gm8075	PREDICTED: predicted gene, EG666385 (EG666385), mRNA
0.0014	3.49	22229	Ucp3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0167	3.49	100043600	Gm4544	PREDICTED: hypothetical protein LOC100047765 (LOC100047765), mRNA
0.0024	3.60	14120	Fbp2	fructose biphosphatase 2 (Fbp2), mRNA
0.0085	3.66	100045752	LOC100045752	PREDICTED: hypothetical protein LOC100045752 (LOC100045752), mRNA
0.0083	3.79	319942	A530016L24Rik	RIKEN cDNA A530016L24 gene (A530016L24Rik), mRNA
0.0022	3.82	55987	Cpxm2	carboxypeptidase X 2 (M14 family) (Cpxm2), mRNA
0.0010	3.83	791359	Gm9961	predicted gene 9961 (Gm9961), non-coding RNA
0.0047	3.83	80978	Mrgprh	MAS-related GPR, member H (Mrgprh), mRNA
0.0088	3.86	319415	Hs3st5	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5 (Hs3st5), mRNA
0.0063	3.89	30952	Cngb3	cyclic nucleotide gated channel beta 3 (Cngb3), mRNA
0.0465	3.94	407814	BC053393	cDNA sequence BC053393 (BC053393), mRNA
0.0097	3.97	13067	Cyct	cytochrome c, testis (Cyct), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0099	4.01	14695	Gnb3	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3 (Gnb3), mRNA
0.0204	4.06	20739	Spna1	spectrin alpha 1 (Spna1), mRNA
0.0247	4.11	100047175	LOC100047175	PREDICTED: hypothetical protein LOC100047175 (LOC100047175), mRNA
0.0090	4.19	13190	Dct	dopachrome tautomerase (Dct), mRNA
0.0284	4.19	319942	A530016L24Rik	RIKEN cDNA A530016L24 gene (A530016L24Rik), mRNA
0.0049	4.35	69522	2310002D06Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2310002D06 gene (2310002D06Rik), mRNA
0.0084	4.53	13190	Dct	dopachrome tautomerase (Dct), mRNA
0.0001	4.97	234421	Cib3	calcium and integrin binding family member 3 (Cib3), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Down-regulated genes				
0.0015	4.97	240595	Kcnv2	potassium channel, subfamily V, member 2 (Kcnv2), mRNA
0.0003	5.02	12561	Cdh4	cadherin 4 (Cdh4), mRNA
0.0226	5.47	69147	2200002J24Rik	RIKEN cDNA 2200002J24 gene (2200002J24Rik), mRNA
0.0058	5.73	66438	Hamp2	hepcidin antimicrobial peptide 2 (Hamp2), mRNA
0.0010	7.07	194974	Sun3	Sad1 and UNC84 domain containing 3 (Sun3), mRNA
0.0003	7.23	12561	Cdh4	cadherin 4 (Cdh4), mRNA
0.0005	9.75	238692	Zfp874	zinc finger protein 874 (Zfp874), mRNA
Up-regulated genes				
0.0087	2.01	244495	Gm4975	PREDICTED: predicted gene, EG244495 (EG244495), mRNA
0.0202	2.01	791370	A130051J06Rik	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130051J06 product:hypothetical protein, full insert sequence.
0.0242	2.03	66959	Dusp26	dual specificity phosphatase 26 (putative) (Dusp26), mRNA
0.0139	2.03	52276	Cdca8	cell division cycle associated 8 (Cdca8), mRNA
0.0157	2.03	69716	Trip13	thyroid hormone receptor interactor 13 (Trip13), mRNA
0.0178	2.04	17121	Mxd3	Max dimerization protein 3 (Mxd3), mRNA
0.0112	2.04	18817	Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila) (Plk1), mRNA
0.0117	2.04	110749	Chaf1b	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60) (Chaf1b), mRNA
0.0117	2.04	66442	Spc25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae) (Spc25), mRNA
0.0032	2.04	545156	Kalrn	kalirin, RhoGEF kinase (Kalrn), transcript variant 2, mRNA
0.0214	2.05	229841	Cenpe	centromere protein E (Cenpe), mRNA
0.0007	2.05	11647	Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (Alpl), mRNA
0.0046	2.05	58801	Pmaip1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Pmaip1), mRNA
0.0108	2.06	52276	Cdca8	cell division cycle associated 8 (Cdca8), mRNA
0.0140	2.06	100045652	LOC100045652	PREDICTED: hypothetical protein LOC100045652 (LOC100045652), mRNA
0.0496	2.06	15950	Ifi203	interferon activated gene 203 (Ifi203), transcript variant 1, mRNA
0.0186	2.06	18991	Pou3f1	POU domain, class 3, transcription factor 1 (Pou3f1), mRNA
0.0114	2.08	66995	Zcchc18	zinc finger, CCHC domain containing 18 (Zcchc18), transcript variant 1, mRNA
0.0068	2.08	108912	Cdca2	cell division cycle associated 2 (Cdca2), transcript variant 2, mRNA
0.0125	2.08	16703	Krtap8-1	keratin associated protein 8-1 (Krtap8-1), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Up-regulated genes

0.0401	2.08	100039474	Gm15452	PREDICTED: similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2) (LOC100044764), mRNA
0.0039	2.09	77717	6030408B16Rik	RIKEN cDNA 6030408B16 gene (6030408B16Rik), non-coding RNA
0.0277	2.10	74075	Syce1	synaptonemal complex central element protein 1 (Syce1), mRNA
0.0011	2.10	100689	Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein (Spon2), mRNA
0.0043	2.11	65086	Lpar3	lysophosphatidic acid receptor 3 (Lpar3), mRNA
0.0193	2.12	60411	Cenpk	centromere protein K (Cenpk), transcript variant 1, mRNA
0.0177	2.13	234396	Ankle1	ankyrin repeat and LEM domain containing 1 (Ankle1), mRNA
0.0319	2.13	217653	C79407	expressed sequence C79407 (C79407), mRNA
0.0500	2.14	76585	Lce1i	late cornified envelope 1l (Lce1i), mRNA
0.0122	2.14	102920	Cenpi	centromere protein I (Cenpi), mRNA
0.0021	2.14	268465	Eme1	essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe) (Eme1), mRNA
0.0023	2.14	22017	Tpmt	thiopurine methyltransferase (Tpmt), mRNA
0.0112	2.15	14199	Fhl1	four and a half LIM domains 1 (Fhl1), transcript variant 1, mRNA
0.0326	2.16	18526	Pcdh10	protocadherin 10 (Pcdh10), transcript variant 2, mRNA
0.0115	2.17	68014	Zwilch	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila) (Zwilch), mRNA
0.0213	2.18	69941	2810408I11Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2810408I11 gene (2810408I11Rik), mRNA
0.0014	2.18	328779	Hs3st6	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 6 (Hs3st6), mRNA
0.0071	2.18	15904	Id4	inhibitor of DNA binding 4 (Id4), mRNA
0.0086	2.18	218977	Dlgap5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5 (Dlgap5), transcript variant 1, mRNA
0.0088	2.18	107995	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae) (Cdc20), mRNA
0.0027	2.18	80879	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (Slc16a3), mRNA
0.0043	2.19	432879	Gm5465	predicted gene 5465 (Gm5465), mRNA
0.0185	2.20	20419	Shcbp1	Shc SH2-domain binding protein 1 (Shcbp1), mRNA
0.0091	2.20	100044858	LOC100044858	PREDICTED: hypothetical protein LOC100044858 (LOC100044858), mRNA
0.0297	2.20	15165	Hcn1	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1 (Hcn1), mRNA
0.0068	2.20	12442	Ccnb2	cyclin B2 (Ccnb2), mRNA
0.0005	2.20	218581	Depdc1b	DEP domain containing 1B (Depdc1b), mRNA
0.0218	2.21	51944	D2Ertd750e	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed (D2Ertd750e), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Up-regulated genes

0.0065	2.21	60530	Fignl1	fidgetin-like 1 (Fignl1), transcript variant 1, mRNA
0.0060	2.22	23834	Cdc6	cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Cdc6), transcript variant 1, mRNA
0.0202	2.22	73804	Kif2c	kinesin family member 2C (Kif2c), mRNA
0.0416	2.22	16571	Kif4	kinesin family member 4 (Kif4), mRNA
0.0115	2.22	320557	Fam169a	family with sequence similarity 169, member A (Fam169a), transcript variant 1, mRNA
0.0031	2.23	20775	Sqle	squalene epoxidase (Sqle), mRNA
0.0200	2.23	104732	4930427A07Rik	RIKEN cDNA 4930427A07 gene (4930427A07Rik), mRNA
0.0022	2.23	77675	5033406O09Rik	RIKEN cDNA 5033406O09 gene (5033406O09Rik), non-coding RNA
0.0099	2.25	269224	Pask	PAS domain containing serine/threonine kinase (Pask), mRNA
0.0036	2.25	80879	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (Slc16a3), mRNA
0.0070	2.25	244579	Tox3	TOX high mobility group box family member 3 (Tox3), mRNA
0.0020	2.26	14235	Foxm1	forkhead box M1 (Foxm1), mRNA
0.0157	2.27	545975	Lass3	LAG1 homolog, ceramide synthase 3 (Lass3), mRNA
0.0181	2.28	15234	Hgf	hepatocyte growth factor (Hgf), mRNA
0.0048	2.28	60411	Cenpk	centromere protein K (Cenpk), transcript variant 1, mRNA
0.0075	2.28	12484	Cd24a	CD24a antigen (Cd24a), mRNA
0.0262	2.29	67121	Mastl	microtubule associated serine/threonine kinase-like (Mastl), mRNA
0.0168	2.30	12449	Ccnf	cyclin F (Ccnf), mRNA
0.0020	2.30	22066	Trpc4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 (Trpc4), mRNA
0.0101	2.31	14793	Cdca3	cell division cycle associated 3 (Cdca3), mRNA
0.0136	2.32	104732	4930427A07Rik	RIKEN cDNA 4930427A07 gene (4930427A07Rik), mRNA
0.0000	2.32	16580	Kifc1	kinesin family member C1 (Kifc1), mRNA
0.0278	2.32	66197	Cks2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (Cks2), mRNA
0.0009	2.32	54720	Rcan1	regulator of calcineurin 1 (Rcan1), transcript variant 2, mRNA
0.0201	2.33	18213	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3), transcript variant 1, mRNA
0.0052	2.34	110033	Kif22	kinesin family member 22 (Kif22), mRNA
0.0182	2.34	637916	LOC637916	PREDICTED: similar to ring finger protein (LOC637916), misc RNA
0.0097	2.34	19361	Rad51	RAD51 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Rad51), mRNA
0.0194	2.36	268697	Ccnb1	cyclin B1 (Ccnb1), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Up-regulated genes

0.0020	2.37	60530	Fignl1	fidgetin-like 1 (Fignl1), transcript variant 1, mRNA
0.0124	2.37	259148	Olfr329-ps	olfactory receptor 329, pseudogene (Olfr329-ps), mRNA
0.0013	2.38	22017	Tpmt	thiopurine methyltransferase (Tpmt), mRNA
0.0353	2.38	381925	Ppapdc1a	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A (Ppapdc1a), mRNA
0.0038	2.38	72080	2010317E24Rik	RIKEN cDNA 2010317E24 gene (2010317E24Rik), mRNA
0.0179	2.38	68203	Diras2	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 2 (Diras2), mRNA
0.0057	2.39	22042	Tfrc	transferrin receptor (Tfrc), mRNA
0.0110	2.39	68861	1190002N15Rik	RIKEN cDNA 1190002N15 gene (1190002N15Rik), mRNA
0.0058	2.39	68743	Anln	anillin, actin binding protein (Anln), mRNA
0.0047	2.40	108907	Nusap1	nucleolar and spindle associated protein 1 (Nusap1), transcript variant 1, mRNA
0.0070	2.41	56702	Hist1h1b	histone cluster 1, H1b (Hist1h1b), mRNA
0.0068	2.41	244579	Tox3	TOX high mobility group box family member 3 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3039593]
0.0090	2.42	73804	Kif2c	kinesin family member 2C (Kif2c), mRNA
0.0103	2.42	76131	Depdc1a	DEP domain containing 1a (Depdc1a), transcript variant 1, mRNA
0.0091	2.43	16323	Inhba	inhibin beta-A (Inhba), mRNA
0.0143	2.44	238377	Gpr68	G protein-coupled receptor 68 (Gpr68), transcript variant 1, mRNA
0.0331	2.46	72107	Dscc1	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae) (Dscc1), mRNA
0.0029	2.46	17865	Mybl2	myeloblastosis oncogene-like 2 (Mybl2), mRNA
0.0269	2.48	791344	E330037I15Rik	2 days pregnant adult female ovary cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E330037I15 product:hypothetical Proline-rich region profile containing protein, full insert sequence.
0.0025	2.48	29870	Gtse1	G two S phase expressed protein 1 (Gtse1), transcript variant 2, mRNA
0.0117	2.50	268697	Ccnb1	cyclin B1 (Ccnb1), mRNA
0.0043	2.50	11799	Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (Birc5), transcript variant 1, mRNA
0.0091	2.52	231869	Gm4870	PREDICTED: similar to cyclin B1 (LOC231869), misc RNA
0.0026	2.52	11799	Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (Birc5), transcript variant 3, mRNA
0.0098	2.54	210719	Mkx	mohawk homeobox (Mkx), mRNA
0.0307	2.56	434175	Gm5593	PREDICTED: predicted gene, EG434175, transcript variant 1 (EG434175), mRNA
0.0062	2.56	77022	2700099C18Rik	RIKEN cDNA 2700099C18 gene (2700099C18Rik), non-coding RNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Up-regulated genes

0.0030	2.58	404710	Iqgap3	IQ motif containing GTPase activating protein 3 (Iqgap3), mRNA
0.0043	2.58	67052	Ndc80	NDC80 homolog, kinetochore complex component (<i>S. cerevisiae</i>) (Ndc80), mRNA
0.0047	2.59	629389	Gm6970	PREDICTED: predicted gene, EG629389 (EG629389), mRNA
0.0188	2.60	12534	Cdk1	cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1), mRNA
0.0058	2.60	71819	Kif23	kinesin family member 23 (Kif23), mRNA
0.0049	2.61	67849	Cdca5	cell division cycle associated 5 (Cdca5), mRNA
0.0042	2.61	22042	Tfrc	transferrin receptor (Tfrc), mRNA
0.0006	2.62	236900	Pdk3	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3 (Pdk3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
0.0036	2.62	74119	1200007C13Rik	adult male lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1200007C13 product:hypothetical Prenyl group binding site (CAAX box) containing protein, full insert sequence.
0.0023	2.63	56742	Psrc1	proline/serine-rich coiled-coil 1 (Psrc1), transcript variant 1, mRNA
0.0061	2.63	53897	Gal3st1	galactose-3-O-sulfotransferase 1 (Gal3st1), transcript variant 1, mRNA
0.0277	2.66	140709	Emid2	EMI domain containing 2 (Emid2), mRNA
0.0013	2.67	245446	Slitrk4	SLIT and NTRK-like family, member 4 (Slitrk4), mRNA
0.0130	2.69	209737	Kif15	kinesin family member 15 (Kif15), mRNA
0.0073	2.71	72391	Cdkn3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (Cdkn3), mRNA
0.0234	2.71	242506	Frmd3	FERM domain containing 3 (Frmd3), transcript variant 1, mRNA
0.0048	2.72	17345	Mki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 (Mki67), mRNA
0.0045	2.72	17345	Mki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 (Mki67), mRNA
0.0132	2.72	76843	Dtl	denticleless homolog (<i>Drosophila</i>) (Dtl), mRNA
0.0039	2.76	12428	Ccna2	cyclin A2 (Ccna2), mRNA
0.0029	2.76	20860	Sult1e1	sulfotransferase family 1E, member 1 (Sult1e1), mRNA
0.0290	2.76	114640	Pth2	parathyroid hormone 2 (Pth2), mRNA
0.0024	2.77	11799	Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (Birc5), transcript variant 3, mRNA
0.0257	2.78	67425	Eps8l1	EPS8-like 1 (Eps8l1), mRNA
0.0085	2.80	13605	Ect2	ect2 oncogene (Ect2), transcript variant 1, mRNA
0.0140	2.81	223650	Eppk1	epiplakin 1 (Eppk1), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Up-regulated genes

0.0130	2.82	69137	2200002K05Rik	RIKEN cDNA 2200002K05 gene (2200002K05Rik), mRNA
0.0106	2.83	77011	5730590G19Rik	RIKEN cDNA 5730590G19 gene (5730590G19Rik), mRNA
0.0132	2.83	76464	Casc5	cancer susceptibility candidate 5 (Casc5), mRNA
0.0070	2.85	66977	Nuf2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae) (Nuf2), mRNA
0.0053	2.86	12316	Aspm	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila) (Aspm), mRNA
0.0279	2.89	68026	2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 gene (2810417H13Rik), mRNA
0.0144	2.89	626152	LOC626152	PREDICTED: similar to epiplakin (LOC626152), misc RNA
0.0057	2.90	26909	Exo1	exonuclease 1 (Exo1), mRNA
0.0031	2.90	234396	Ankle1	ankyrin repeat and LEM domain containing 1 (Ankle1), mRNA
0.0060	2.91	94353	Hmgn3	high mobility group nucleosomal binding domain 3 (Hmgn3), transcript variant b, mRNA
0.0015	2.91	233406	Prc1	protein regulator of cytokinesis 1 (Prc1), mRNA
0.0040	2.91	58869	Pex5l	peroxisomal biogenesis factor 5-like (Pex5l), transcript variant 1, mRNA
0.0050	2.93	235415	Cplx3	complexin 3 (Cplx3), mRNA
0.0029	2.93	22066	Trpc4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 (Trpc4), mRNA
0.0029	2.94	22042	Tfrc	transferrin receptor (Tfrc), mRNA
0.0061	3.00	16551	Kif11	kinesin family member 11 (Kif11), mRNA
0.0060	3.01	18612	Etv4	ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF) (Etv4), mRNA
0.0036	3.02	72119	Tpx2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis) (Tpx2), transcript variant 2, mRNA
0.0015	3.03	72415	Sgol1	shugoshin-like 1 (S. pombe) (Sgol1), mRNA
0.0277	3.13	70466	Ckap2l	cytoskeleton associated protein 2-like (Ckap2l), mRNA
0.0326	3.13	74189	Phactr3	phosphatase and actin regulator 3 (Phactr3), transcript variant 1, mRNA
0.0045	3.13	18005	Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2 (Nek2), mRNA
0.0014	3.15	71878	Fam83d	family with sequence similarity 83, member D (Fam83d), mRNA
0.0010	3.15	80986	Ckap2	cytoskeleton associated protein 2 (Ckap2), mRNA
0.0020	3.16	54141	Spag5	sperm associated antigen 5 (Spag5), mRNA
0.0012	3.18	245446	Slitrk4	SLIT and NTRK-like family, member 4 (Slitrk4), mRNA
0.0167	3.22	235416	Lman1l	lectin, mannose-binding 1 like (Lman1l), mRNA
0.0032	3.22	208836	Fanci	Fanconi anemia, complementation group I (Fanci), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Up-regulated genes

0.0026	3.25	26886	Cenph	centromere protein H (Cenph), mRNA
0.0286	3.26	383619	Aim2	absent in melanoma 2 (Aim2), mRNA
0.0004	3.26	70218	Kif18b	kinesin family member 18B (Kif18b), mRNA
0.0047	3.28	629389	Gm6970	PREDICTED: predicted gene, EG629389 (EG629389), mRNA
0.0051	3.28	71988	Esco2	establishment of cohesion 1 homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>) (Esco2), mRNA
0.0017	3.35	12236	Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (<i>S. cerevisiae</i>) (Bub1b), mRNA
0.0122	3.37	18213	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3), transcript variant 2, mRNA
0.0019	3.47	17279	Melk	maternal embryonic leucine zipper kinase (Melk), mRNA
0.0232	3.48	14219	Ctgf	connective tissue growth factor (Ctgf), mRNA
0.0022	3.53	621880	Gm12387	PREDICTED: similar to PDZ binding kinase (predicted) (LOC621880), misc RNA
0.0021	3.56	208628	Kntc1	kinetochore associated 1 (Kntc1), mRNA
0.0032	3.59	21973	Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha (Top2a), mRNA
0.0176	3.61	18213	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3), transcript variant 1, mRNA
0.0155	3.76	791275	Gm9885	ENSMUSG00000052629 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q91VZ9]
0.0027	3.82	109212	Fam64a	family with sequence similarity 64, member A (Fam64a), mRNA
0.0020	3.85	58802	Kcnmb4	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4 (Kcnmb4), mRNA
0.0015	3.89	17318	Mid1	midline 1 (Mid1), transcript variant 2, mRNA
0.0170	3.94	18213	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3), transcript variant 2, mRNA
0.0031	3.95	66468	Ska1	spindle and kinetochore associated complex subunit 1 (Ska1), transcript variant 1, mRNA
0.0104	3.96	228770	Rspo4	R-spondin family, member 4 (Rspo4), transcript variant 1, mRNA
0.0358	4.01	69564	Itgb1bp3	integrin beta 1 binding protein 3 (Itgb1bp3), mRNA
0.0417	4.04	677559	LOC677559	PREDICTED: similar to Interferon-activable protein 204 (Ifi-204) (Interferon-inducible protein p204) (LOC677559), mRNA
0.0029	4.06	243043	Kctd8	potassium channel tetramerisation domain containing 8 (Kctd8), mRNA
0.0031	4.09	12235	Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Bub1), transcript variant 2, mRNA
0.0009	4.19	19662	Rbp4	retinol binding protein 4, plasma (Rbp4), transcript variant 1, mRNA
0.0014	4.24	234258	Neil3	nei like 3 (<i>E. coli</i>) (Neil3), mRNA

Supplemental table S3: Microarray predicted aldosterone-regulated genes in MR-Cardio mice (Aldo-treated MR-Cardio mice vs untreated MR Cardio mice)

Up-regulated genes				
0.0017	4.36	52033	Pbk	PDZ binding kinase (Pbk), mRNA
0.0014	5.65	240913	Adamts4	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4 (Adamts4), mRNA

Genes are classified according to the fold change. Some genes may appear more than one time. P: P-Value; FC: Fold change.

Les cibles moléculaires du récepteur minéralocorticoïde dans le cœur

Résumé :

L'hormone minéralocorticoïde aldostérone en se fixant à son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde (RM), module la réabsorption de sodium au niveau du rein. De nombreuses études ont rapporté l'implication du complexe aldostérone/RM dans les pathologies cardiovasculaires, sans que les voies de signalisation activées soient encore entièrement élucidées à ce jour. Ce travail de thèse se propose d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de la signalisation cardiaque du RM à travers deux objectifs principaux i) l'identification de nouvelles cibles moléculaires du RM dans le cœur et ii) la compréhension des effets physiopathologiques de son activation. Par une approche pharmacologique, nous avons montré que le diurétique torasémide n'est pas capable de bloquer la voie de signalisation minéralocorticoïde dans la lignée cellulaire de cardiomyocyte transfectée avec le RM, H9C2-RM⁺. L'étude de l'activité transcriptionnelle du RM cardiaque a concerné la majeure partie de ce travail de thèse. Par une approche gène candidat, nous avons mis en évidence que l'expression du gène codant pour le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF, pour *connective tissue growth factor*) est augmentée par le RM et que l'aldostérone potentialise cet effet *in vivo*. Nous avons pu localiser CTGF spécifiquement dans les cardiomyocytes, et une étude *in vitro* nous a permis d'identifier que le RM se lie au niveau d'éléments de réponse hormonale dans le promoteur du gène codant pour CTGF. Des souris surexprimant le RM humain spécifiquement dans les cardiomyocytes et traitées avec de l'aldostérone ou de la corticostérone ont permis une exploration plus large des gènes différentiellement exprimés par les deux ligands du RM dans le cœur. L'analyse des transcriptomes cardiaques de ces souris et de leurs contrôles montre qu'une augmentation modeste de la concentration plasmatique en aldostérone induit dans le cœur l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme la Cycline B1 ou sa kinase associée Cdk1 (pour *Cyclin-dependent kinase 1*). Nous avons montré également que l'aldostérone active la prolifération des cellules endothéliales cardiaques.

Mots clés : aldostérone, récepteur minéralocorticoïde, cœur, prolifération, sélectivité minéralocorticoïde, pathologies cardiovasculaires

Molecular targets of the mineralocorticoid receptor in heart

Abstract :

The mineralocorticoid hormone aldosterone binding its receptor, the mineralocorticoid receptor (MR), regulates the renal reabsorption of sodium. Several studies showed the involvement of the aldosterone/MR complex in cardiovascular diseases, even if the activated signalling pathways are still unclear. This thesis work has been established to increase the knowledge on the mechanisms of the cardiac signalling of MR using two main purposes i) the identification of new molecular targets of the MR in the heart and ii) the understanding of the pathophysiological effects of its activation. A pharmacological approach showed that the diuretic torasemide cannot block the mineralocorticoid signalling in the cell line cardiomyocytes transfected with MR, H9C2-MR⁺. The study of the MR's cardiac transactivation activity formed the most important part of this thesis work. We demonstrated with a candidate gene approach that the MR increases the expression of the gene coding the *connective tissue growth factor* (CTGF) and the aldosterone increases even more this effect *in vivo*. We found CTGF specifically expressed in cardiomyocytes and we identified *in vitro* that the MR binds to hormonal responsive elements on the promoter of the gene coding CTGF. In order to investigate the whole genes differentially expressed by the two ligands of MR in the heart, we treated mice with cardiomyocyte-targeted human MR overexpression and their controls with aldosterone or corticosterone. The cardiac transcriptomic analyses show that the majority of aldosterone-regulated genes is involved in cell division as *Cyclin B1* or *Cyclin-dependent kinase 1* (Cdk1). Also, we identified that aldosterone promotes cardiac endothelial cells proliferation.

Keywords : aldosterone, mineralocorticoid receptor, heart, proliferation, mineralocorticoid selectivity, cardiovascular pathologies